Elektronenoptische Untersuchungen über eine selektive Kontrastierbarkeit von Bestandteilen pflanzlicher Zellen

GÜNTER SIEGL

1967

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Anton Mayr

ELEKTRONENOPTISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER EINE SELEKTIVE KONTRASTIERBARKEIT VON BESTANDTEILEN PFLANZLICHER ZELLEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Günter Siegl
aus Wickwitz/Sudetenland
1967

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. Anton Mayr

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. Leo Brauner

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Mai 1967

Foto-Druck Frank, 8 München 13, Zieblandstraße 39, Telefon 597397,

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A) Einleitung	1
B) Zur Problematik der Kontrastierung in der Elektronenmikroskopie	3
C) Eigene Untersuchungen	9
I) Material und Methoden	9
1.) Biologisches Material	9
2.) Fixierung	9
3.) Entwässerung	10
4.) Einbettung	10
5.) Ultramikrotomie und Kontrastierung	11
6.) Elektronenmikroskopie	11
II) Auswertverfahren der Kontrastierungsversuche	12
III) Versuche und Ergebnisse	13
1.) Allgemeiner Verlauf der Kontrastierung	13
2.) Kontrastierungseigenschaften verschiedener Metallsalze	15
a) Kontrastierung nach der Fixierung mit Osmiumtetroxyd	15
b) Kontrastierung nach der Fixierung mit Glutaraldehyd	21
3.) Bestimmung der an der Kontrastierung beteiligten chemischen Gruppen des biologischen Präparates	22
a) Blockierung der Carboxyl-, Phosphat- und Sulfonsäuregruppen	30

Seite

b) Blockierung der Reaktionsfähigkeit von Carbonylgruppen 36

c) Blockierung von Aminogruppen 39

d) Gleichzeitige Blockierung von Hydroxyl- und Aminogruppen 39

e) Gleichzeitige Blockierung von Amino-, Sulfhydryl-, phenolischen Hydroxyl- und Imidazolgruppen 40

f) Einführung neuer Phosphatgruppen unter gleichzeitiger Blockierung von Sulfhydryl- Hydroxyl- und Aminogruppen 41

g) Einführung von Schwefelsäuregruppen in Kohlenhydrate 43

h) Kontrastierung der nach a) bis g) behandelten Gewebe mit alkoholischen Salzlösungen 43

4.) Durchführung der Blockierungsreaktionen an Ultradünnschnitten 48

5.) Komplexbildung zwischen Metallionen und chemischen Bausteinen der Zellen und ihre Verwendung zur selektiven Kontrastierung einzelner Gruppen 51

a) Theoretische Überlegungen 51

b) Experimentelle Prüfung 52

D) Besprechung der Ergebnisse 62

E) Zusammenfassung 84

F) Literaturverzeichnis 86

A) EINLEITUNG

Seit der Entwicklung spezifischer Färbeverfahren ist es in der Lichtmikroskopie möglich, Strukturen pflanzlicher und tierischer Zellen sichtbar zu machen, die in der Größenordnung des theoretischen Auflösungsvermögens des Lichtmikroskopes liegen. Auch in der Elektronenmikroskopie ist die Sichtbarmachung kleiner biologischer Strukturen von dem Kontrast abhängig, durch den sie sich von den übrigen Zellbestandteilen abheben. Die Entwicklung spezifischer Kontrastierungsverfahren kommt deshalb einer Annäherung des praktisch erreichbaren an das theoretisch vorhandene Auflösungsvermögen des Elektronenmikroskopes gleich.

Der Kontrast elektronenoptischer Bilder ist den Arbeitsbedingungen des Mikroskopes, d. h. der Beschleunigungsspannung der Elektronen und den verwendeten Aperturblenden umgekehrt proportional. Andererseits steht er zur Dicke und zur Dichte des Präparates in direkter Beziehung. Durch Anlagerung chemischer Verbindungen, deren Bausteine sich gegenüber den Grundelementen biologischer Strukturen durch ein um ein Vielfaches erhöhtes Atomgewicht auszeichnen, kann daher eine Kontraststeigerung erreicht werden.

In den letzten zehn Jahren wurde eine große Anzahl von Schwermetallsalzen empirisch auf Ihre Eignung zur Kontrastierung von Zellkomponenten im elektronenoptischen Bild untersucht. Die Spezifität einzelner Kontrastierungsverfahren für bestimmte biologische Bausteine ließ sich dabei nur selten sichern. Außerdem konnten nur in wenigen Fällen Angaben über die Art der Bindung der Metallionen an das chemische Gerüst der Ultrastrukturen gemacht werden. Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die kontraststeigernde Wirkung verschiedener Metallsalze an elektronenmikroskopischen Präparaten

pflanzlicher Zellen miteinander zu vergleichen und eine mögliche Spezifität für bestimmte zelluläre Ultrastrukturen zu erfassen. Über die Bestimmung der chemischen Gruppen des Präparates, die für die Bindung der Metallionen verantwortlich sind, und über die Feststellung der Bedingungen unter welchen sie mit diesen in Wechselwirkung treten, sollten selektive Kontrastierungsverfahren ausgearbeitet werden.

B) ZUR PROBLEMATIK DER KONTRASTIERUNG IN DER ELEKTRONEN-MIKROSKOPIE

Über die tatsächlichen Vorgänge bei der Kontrastierung histologischer Präparate für die Elektronenmikroskopie ist noch sehr wenig bekannt. Ein Vergleich der Ergebnisse ist ebenfalls sehr schwer, da nur selten unter vergleichbaren Bedingungen gearbeitet wurde, denn jede spezielle Fixierung, Entwässerung und Einbettung verändert das Gewebe dabei in ganz spezifischer Weise. Selbst die Auswahl des Versuchsobjektes ist bereits von ausschlaggebender Bedeutung. Pflanzenzellen erfordern andere Präparationsmethoden als tierische Zellen, ja die Empfindlichkeit der Gewebe kann bereits von Organ zu Organ des gleichen Organismus stark variieren. Außerdem sind unsere Kenntnisse über den chemischen Bau der Ultrastrukturen von Zellen und Geweben noch lückenhaft.

Von den verschiedenen Präparationsschritten, die ein lebendes Gewebe bis zu seiner Abbildung im Elektronenmikroskop durchlaufen muß, kann die Fixierung, d. h. der chemisch-physikalische Eingriff in den lebenden Organismus zur Konservierung seiner Mikromorphologie über den Tod hinaus, zu den größten morphologischen wie auch chemischen Veränderungen führen. Eine der Grundvoraussetzungen für die erfolgreiche Anwendung des Elektronenmikroskopes in der Biologie und der Medizin war deshalb die Auffindung geeigneter Fixierungsmethoden.

Ausgehend von der Erfahrung, daß die Feinstrukturen von Zellen durch Behandlung mit Osmiumtetroxyd bis an die Grenzen des lichtmikroskopischen Auflösungsvermögens erhalten bleiben (106), entwickelte man eine Präparationsmethode, die den hohen Anforderungen der Elektronenmikroskopie entspricht (3, 8, 12, 21, 23, 25, 51, 69, 74, 79, 87, 88,

92, 118, 119). Auch andere Oxydationsmittel wie Chromate (20, 26, 65) und Kaliumpermanganat, das besonders in der Botanik Anwendung findet, wurden zur Fixierung herangezogen (37, 54, 66, 80, 98, 112). Ebenfalls von der lichtmikroskopischen Histologie kamen Präparationsverfahren, die Formaldehyd als Fixativ enthalten. Sie wurden entsprechend den neuen Erfordernissen umgearbeitet und verbessert (22, 82, 97). Für die Anfänge einer elektronenmikroskopischen Histochemie verwendete man dann weitere Aldehyde wie Glutaraldehyd (97) und Acrolein (67, 73, 110), die beide die Feinstrukturen der biologischen Objekte besser als Formalin erhalten.

Neben einigen wenigen Versuchen mit anderen chemischen Fixierungsmitteln wie z. B. Trichloressigsäure für Pflanzenzellen (40), Äthylalkohol (38, 110) und Buttersäure (83), ist für die Elektronenmikroskopie noch die physikalische Methode der Gefrierfixation wichtig (81).

Abgesehen von den Veränderungen, die Puffer, Stabilisierungszusätze und Lösungsmittel, in welchem die Fixative zur Anwendung kommen, im Präparat hervorrufen, beeinflußt jedes dieser Fixative die chemisch-physikalische Reaktionsfähigkeit der Zellkomponenten in der Kontrastierung in spezifischer Weise. Für das Aussehen des endgültigen elektronenoptischen Bildes sind diese Fixierungsreaktionen daher von entscheidender Bedeutung.

Osmiumtetroxyd reagiert als starkes Oxydationsmittel mit Mehrfachbindungen in Lipiden und zyklischen Verbindungen, mit Sulfhydrilgruppen, Disulfidbindungen, tertiären Aminen, Amino-, Hydroxyl- und Aldehydgruppen. Es entstehen dabei Sulfonsäurederivate, Ketone und Carbonsäuren. Außerdem bildet OsO_4 mit tertiären Basen leicht stabile Koordinationskomplexe und niedere Osmiumoxyde werden im Gewebe abgelagert (1, 7, 24, 32, 45, 84, 52, 56, 77, 86, 94, 95, 103, 105, 115, 116, 117). Kaliumpermanganat soll sich ähnlich verhalten (15, 45).

Im Gegensatz zu den Oxydationsmitteln stabilisieren die Aldehyde das biologische Material hauptsächlich durch Vernetzungsreaktionen mit den an Polypeptidketten seitenständigen Amino- und Iminogruppen und reaktivem Wasserstoff (2, 14, 33, 34). Völlig frei von chemischen Veränderungen bleiben die Zellen bei Präparation mit der Gefrierfixation (81).

Das von der Fixierung in so verschiedener Weise zurückgelassene Material wird anschließend bei der zur Gewinnung von Ultradünnschnitten notwendigen Stabilisierung durch Einbettung in Kunstharze in seinen für das Ergebnis der Kontrastierung maßgeblichen Eigenschaften weiter beeinflußt. Die zellulären Endprodukte der schon in Modellversuchen nur selten klar überschaubaren Fixierungsreaktionen treten dabei mit dem zur Entwässerung verwendeten organischen Lösungsmittel und dem organischen Einbettungsmittel in Wechselwirkung. Zum Entwässern werden hauptsächlich Äthylalkohol und Azeton verwendet, während die Auswahl eines der vielen, z. T. auch mit Wasser mischbaren Einbettungsmittel (31, 39, 61, 62) von den besonderen Anforderungen des Präparates abhängig ist. Kunstharz, Alkohol und Azeton wirken als Lösungsmittel mit spezifischen Eigenschaften. Aus Aldehyd-behandeltem Gewebe werden durch sie vor allem die nicht fixierten Lipide der Membransysteme herausgelöst und Epoxyharze sollen nach OsO_4-Fixation zur Entfernung der niederen Osmiumoxyde aus dem Gewebe führen. Da die Kontrastierung während der Entwässerung am unzerteilten, fixierten Präparat oder an den nach der Einbettung hergestellten Dünnschnitten vorgenommen werden kann, ist die Unkenntnis der Lösungsvorgänge während der Einbettung ein nicht zu unterschätzender Unsicherheitsfaktor beim Vergleich einzelner, unter verschiedenen Bedingungen erzielter Kontrastierungsergebnisse.

Das erste mit Erfolg in der elektronenmikroskopischen Histologie angewandte Kontrastierungsmittel war Phosphorwolframsäure (43). Nach

ihr wurden Uransalze (49, 93, 101, 107, 111), Bleisalze, vor allem Bleihydroxyd (27, 53, 75, 78, 89, 91, 108, 109), Kaliumpermanganat (28, 59), Lanthannitrat (17, 19, 30, 44) und Vanadiumsalze (16, 30), um nur einige der wichtigsten Metallsalze zu nennen, auf ihre Verwendbarkeit empirisch untersucht. Gersh und Mitarbeiter prüften allein 52 verschiedene Metallverbindungen auf ihr Kontrastierungsvermögen an gefrierfixiertem Gewebe (38).

Während die ersten Kontrastierungsversuche vor allem das Ziel hatten, den Kontrast des biologischen Materials im Elektronenmikroskop überhaupt zu erhöhen, wurde schon bald versucht, die Bindung der Metallsalze mit bestimmten chemischen Gruppen des Präparates in Verbindung zu setzen und so möglicherweise Gruppen- oder Zellkomponentenspezifische Färbeverfahren zu entwickeln. Phosphorwolframsäure soll sowohl nach Formalinfixierung wie auch nach Osmiumfixierung und anschließender Entfernung des reduzierten Osmiums mit Hilfe von Wasserstoffperoxyd spezifisch für die Plasmamembranen sein (11, 58). Für Uranylionen wird die Bindung an Hydroxyl-, Carbonyl- und Phosphatgruppen und eine besondere Affinität für Nukleinsäuren beschrieben (50, 71, 96, 104, 120). Auch Bleihydroxyd soll besonders den Kontrast nukleinsäurehaltiger Strukturen, nach Aldehydfixierung spezifisch den der Ribosomen und des Nukleolus erhöhen (70, 71).

Das erste theoretisch ausgearbeitete, spezifische Kontrastierungsreagenz der Elektronenmikroskopie war 1953 die Gallozyanin-Indiumalum "Färbung" für Nukleinsäuren von Bahr (5). Es hat jedoch bis heute kaum praktische Bedeutung erlangt. Ebenso mehr von theoretischem Interesse sind die Methoden der Kontrastierung von proteingebundenen Sulfhydrylgruppen mit Methylquecksilberchlorid (6), die Umsetzung von Proteinen mit 1-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol, Kopplung dieses Reaktionsproduktes mit 4-Methyl-1,2-Merkaptobenzol oder 1-Amino-8-Hydroxynaphtalin-4,6-Disulfonsäure und "Färbung" der so eingeführten Sulfhydryl-

oder Sulfonsäuregruppen mit Silber- oder Bleiionen (57), oder die Kopplung der Protein-Aminogruppen mit N-acetylhomocysteinthiolaceton und Sichtbarmachung dieses Komplexes mit Silberionen (55).

Wesentlich bessere Ergebnisse brachten die Versuche von Watson und Aldridge (110) und Wetzel und Mitarbeitern (113). Man versuchte durch chemische Blockierung alle nicht interessierenden reaktionsfähigen Gruppen des Präparates in der Kontrastierungsreaktion auszuschalten. Watson und Aldridge gelangten so zu einer spezifischen Hervorhebung von Nukleinsäuren und Wetzel und Mitarbeiter zu einer elektronenoptischen Lokalisierung von sauren Mucopolysacchariden.

Für die Auswertung und den Vergleich der erzielten Kontrastierungsergebnisse sind nun nicht nur die Reaktionsabläufe bei der Fixierung, der Einbettung und der Kontrastierung von Bedeutung, sondern auch die Bedingungen, unter denen das Präparat im Elektronenmikroskop abgebildet wird. Auf die Gesetzmäßigkeit, nach welcher der Kontrast umgekehrt proportional der Beschleunigungsspannung der Elektronen und den Aperturblenden ist, wurde bereits hingewiesen. Wesentlich größere und schlechter kontrollierbare Veränderungen entstehen jedoch durch die Wechselwirkung zwischen dem abbildenden Elektronenstrahl und dem Objekt. So ist zum Beispiel der gute Kontrast, den biologisches, in Methacrylat eingebettetes Material im Elektronenmikroskop zeigt, in der Hauptsache auf die Sublimation des Einbettungsmittels unter Elektronenbeschuß zurückzuführen. In Schnitten unterhalb einer Dicke von 400 Å kann dabei bis zu 55 % des Methacrylates verloren gehen (80), während die modernen Epoxyharze deutlich stabiler sind. Die Wirkung des Elektronenstrahls auf das Objekt kann soweit gehen, daß an zwei Dünnschnitten ein und derselben Präparation je nach den Bestrahlungsbedingungen eine fragliche Komponente wie zum Beispiel das Kernchromatin, einmal mit positivem und einmal mit negativem Kontrast gegenüber dem Zellhintergrund zu beobachten ist (63).

Um eine Basis für den Vergleich der Wirkung einzelner Kontrastierungsmittel zu schaffen, müssen die Unsicherheitsfaktoren der Fixierung, der Entwässerung, der Einbettung und der Arbeitsbedingungen des Mikroskopes auf ein Mindestmaß beschränkt werden. Bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde dies dadurch erreicht, daß außer dem Vorgang der Kontrastierung alle Präparationsbedingungen konstant gehalten worden sind.

C) EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I) Material und Methoden

1.) Biologisches Material

Sämtliche Versuche wurden am Gewebe der Wurzelspitzen von Allium cepa durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Zwiebeln auf wassergefüllten Gläsern zum Keimen gebracht, und sobald ihre Wurzeln eine Länge von 2 cm erreicht hatten, wurden die ersten 2 mm der Spitzen mit der Rasierklinge abgetrennt und sofort fixiert.

2.) Fixierung

Die beiden zur Zeit in der elektronenmikroskopischen Histologie gebräuchlichsten Fixierungsmittel, die Osmiumfixierung nach Palade (87) und die Glutaraldehydfixierung nach Sabatini und Mitarbeitern (97) kamen in etwas abgeänderter Form zur Anwendung. Die von Palade vorgeschlagene zweiprozentige, mit Michaelispuffer (Veronalnatrium - Natriumacetat) auf pH=7,4 und durch Zusatz von 0,15 m Saccharose auf Blutisotonie eingestellte Osmiumtetroxydlösung ist durch Erhöhung des Saccharoseanteils auf 0,2 m gebracht und damit an die osmotischen Verhältnisse der Wurzelzellen angeglichen worden.

Das Glutaraldehydfixativ setzte sich aus 6 % Glutaraldehyd (Serva, Heidelberg) in 0,15 m Phosphatpuffer nach Sörensen (Na_2HPO_4-KH_2PO_4) von pH=7,4 und 0,1 m Saccharose zusammen. Bei Zusatz dieser Saccharosemenge konnten in Vorversuchen kaum Plasmolyseeffekte während der Fixation beobachtet werden.

Die Fixierungsdauer betrug mit Osmiumtetroxyd eine Stunde und mit Glutaraldehyd vier Stunden. Die Temperatur der Lösung wurde während dieser Zeit bei +4°C gehalten.

3.) Entwässerung

Nach der Fixierung wurde das Gewebe zur Entfernung der überschüssigen Fixierungsmittel mit der jeweiligen Pufferlösung bei 4°C gewaschen. Bei OsO_4-Fixierung erstreckte sich dieser Vorgang mit dreimaligem Wechseln der Lösung auf 30 Minuten und bei Glutaraldehydfixation nach Vorschlag von Sabatini auf 12 Stunden.

Die anschließende Entwässerung des Gewebes erfolgte mit einer Äthylalkoholreihe während jeweils 30 Minuten in 30, 50, 70, 90 und 95 % und 60 Minuten mit dreimaligem Wechseln des Alkohols in 100 % Äthanol. Bis zu einer Alkoholkonzentration von 70 % fand die Entwässerung im Kühlschrank, bei den höheren Konzentrationen jedoch bei Zimmertemperatur statt.

4.) Einbettung

Die Einbettung des Gewebes erfolgte in Epon 812 mit einem etwas abgeänderten Verfahren nach Luft (68). Das fertige Einbettungsmittel setzte sich in folgender Weise zusammen:

Mischung A: 62 ml Epon 812 (Serva, Heidelberg)
100 ml Dodecenyl-succinicanhydride (Nordwald, Hamburg)

Mischung B: 100 ml Epon 812
89 ml Methyl-nadic-anhydride (Nordwald, Hamburg)

A und B wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und mit 1,7 Volumenprozent 2,4,6-tri(dimethylaminomethyl)phenol (Röhm & Haas, Philadelphia) als Beschleuniger versetzt.

Nach der letzten Entwässerungsstufe kamen die fixierten Wurzelspitzen für 60 Minuten bei Zimmertemperatur in ein Gemisch aus gleichen Teilen 100%igem Äthanol und fertigem Einbettungsmittel und anschliessend über Nacht, ebenfalls bei Zimmertemperatur, in das fertige Epongemisch. Nach Überführung der mit Epon durchtränkten Präparate mit

neuem Einbettungsmittel in Gelatinekapseln (Größe 1, Parke, Davis & Co, Detroit) erfolgte die Polymerisation des Kunstharzes während 48 Stunden bei 60 °C.

5.) Ultramikrotomie und Kontrastierung

Die Präparate wurden am LKB-Ultratome mit Glasmessern geschnitten und die Schnitte auf Kupfernetzen (Durchmesser 2,3 mm von N. V. V. E. C. O. Zeefplatenfabriek, Eerbeek, Holland) aufgetragen, die zuvor mit Formvar befilmt (o,15 % Pioloform F in Chloroform) und zur Stabilisierung im Vakuumbedampfungsgerät mit Kohle bedampft worden waren. Die Schnitte zeigten im reflektierten Licht auf der Wasseroberfläche des Auffangtroges graue Farbe. Das entspricht einer Schnittdicke zwischen 400 und 500 Å. Zur Kontrastierung wurden die Trägernetze mit den Schnitten nach unten auf die Oberfläche der Kontrastierlösung gelegt. Nähere Angaben über Volumen, Konzentration, Temperatur und Kontrastierungszeit sind aus den Tabellen der Ergebnisse ersichtlich.

6.) Elektronenmikroskopie

Zur Abbildung der Präparate stand ein Siemens Elmiskop 1 mit Doppelkondensor zur Verfügung. Die ARBEITSBEDINGUNGEN waren: Kondensor 1 (Feinstrahlkondensor) 2/3 fokussiert, Kondensor 2 voll fokussiert, Kondensorblende 400 μ, Objektivblende 50 μ, Polschuh 2 des Projektivs (mögliche Maximalvergrößerung 40 000-fach), Arbeitsvergrößerung 16 000-fach, Beschleunigungsspannung 80 KV, Kathodenspannung 2,5 V, Strahlstrom 20 μA.

Aufnahmen wurden auf Photoplatten der Größe 6,5 x 9 (Elektroguil von S. A. R. Guileminot, Boespflug & C^{ie}, Paris) gemacht und je nach Anforderung vergrößert.

II) Auswertverfahren der Kontrastierungsversuche

Zum Vergleich der Kontrastierungseigenschaften einzelner Salze und für Aussagen über den Ablauf des Kontrastierungsvorganges war ein wenigstens annähernd quantitatives Auswertverfahren unerläßlich. Zu diesem Zweck wurde der Kontrast des Kernchromatins OsO_4-fixierter Zellen nach einstündiger Behandlung mit Bleihydroxyd nach Watson (109) als Normkontrast verwendet und die Intensität aller übrigen Kontrastierungen in Bruchteilen davon angegeben. Bei allen fraglichen Kontrastierungen erfolgte die Auswertung subjektiv direkt am Bild des Präparates im Elektronenmikroskop. Sie ist stets in folgender Weise vorgenommen worden:

1.) Feststellung der Kontrastintensität des Kernchromatins im Verhältnis zum Normkontrast
2.) Festsetzung der Verhältnisse der Kontrastintensitäten der übrigen Zellkomponenten zum Normkontrast.
3.) Vergleich der Kontrastintensitäten der einzelnen Zellkomponenten zur Intensität des Kernchromatins. Der Vergleich nach 3) muß die gleichen Intensitätsverhältnisse ergeben wie die Bewertung nach 1) und 2).

Nach Beer (9) kann die Fehlerwahrscheinlichkeit quantitativer Aussagen bei Auswertung von 20 elektronenoptischen Bildern auf ein Minimum herabgedrückt werden. Für jeden Kontrastierungsversuch wurden deshalb 20 Schnitte eingesetzt, die für sämtliche Kontrastierungen innerhalb einer Versuchsreihe in gleichen Anteilen von drei gleichen Präparatblöcken gewonnen worden waren. Zwei der Blöcke stammten aus derselben Einbettung und der dritte aus einer Wiederholungspräparation. In den Tabellen der Versuchsergebnisse erscheinen nur Mittelwerte dieser 20 Ergebnisse.

III) Versuche und Ergebnisse

1.) Allgemeiner Verlauf der Kontrastierung

Damit die Kontrastierungseigenschaften verschiedener Metallsalze verglichen werden konnten, war es wichtig, den Einfluß einzelner Parameter wie Kontrastierungszeit, Konzentration der Lösung und der Temperatur auf den ausgebildeten Endkontrast zu kennen. Diese Vorversuche wurden mit einer wässerigen Kobaltchlorid- und einer wässerigen Uranylazetatlösung durchgeführt.

Aus den Abbildungen 1 und 2 ist zu ersehen, daß für beide Kontrastrierungen eine Beziehung zwischen der Konzentration der Lösung, der Kontrastierungszeit und dem Kontrast am ultrahistologischen Schnitt besteht. Unterhalb einer Konzentration von 10^{-5}m bei Uranylacetat und 10^{-4}m bei Kobaltchlorid führt die Verlängerung der Einwirkungszeit noch zu keiner Kontraststeigerung. Im anschließenden Konzentrationsbereich kann der gleiche Kontrast jedoch entweder durch kurzzeitige Behandlung mit einer Lösung hoher oder durch längeres "Färben" mit einer Salzlösung niederer Konzentration erreicht werden. Ist das Aufnahmevermögen der Ultrastrukturen für Metallionen erschöpft, so läßt sich der Endkontrast weder durch Verlängern der "Färbezeit" noch durch Erhöhung der Konzentration weiter steigern. Kontrastierungszeiten über 60 Minuten führten in keinem Konzentrationsbereich zu einem weiteren Kontrastgewinn.

Der Einfluß der Temperatur scheint vernachlässigt werden zu können. Bei Kontrastierungsversuchen mit verschiedenen Salzkonzentrationen und verschiedener Zeit konnten bei Temperaturen von 20°, 30° und 60°C keine Unterschiede festgestellt werden.

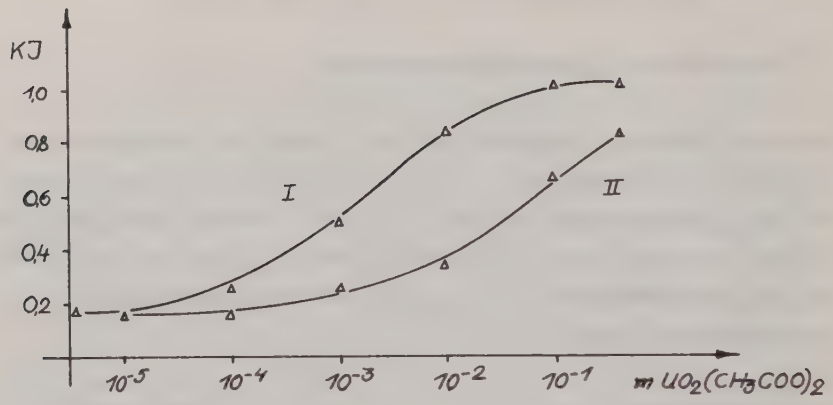


Abb. 1. Abhängigkeit des Kontrastes des Kernchromatins von der Konzentration der Uranylionen in der Lösung.

KJ: Verhältnis des beobachteten Kontrastes zum Normkontrast
I: Kontrastierungszeit 60 Minuten
II: Kontrastierungszeit 5 Minuten

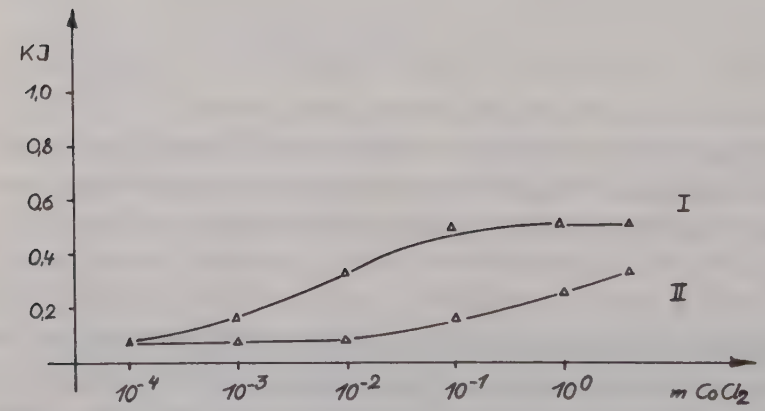


Abb. 2. Abhängigkeit des Kontrastes des Kernchromatins von der Konzentration der Kobalt II-Ionen in der Lösung

KJ: Verhältnis des beobachteten Kontrastes zum Normkontrast
I: Kontrastierungszeit 60 Minuten
II: Kontrastierungszeit 5 Minuten

2.) Kontrastierungseigenschaften verschiedener Metallsalze

Zur Überprüfung der Kontrastierungseigenschaften einzelner Metallsalze wurde nach der beschriebenen Methodik sowohl an OsO_4- als auch an Glutaraldehyd-fixiertem Gewebe gearbeitet. Die Konzentration der Salzlösungen lag zwischen 0,1 m und 1 m; die Färbezeit betrug grundsätzlich 60 Minuten und die Temperatur 20°C. Nach den Ergebnissen der Abbildungen 1 und 2 war unter diesen Bedingungen im allgemeinen die Ausbildung des maximal möglichen Kontrastes zu erwarten.

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse nach der in der Lösung bevorzugt vorkommenden Form der Metallionen und nach dem Atomgewicht des Elementes, bzw. bei Komplexen nach dem Molgewicht des Komplexions geordnet.

a) Kontrastierung nach der Fixation mit Osmiumtetroxyd

Der Vergleich einzelner Kontrastierungsmittel sollte zeigen, ob es Metallionen gibt, die den Kontrast einer Zellkomponente oder einer Molekülgruppe gegenüber den sonstigen Bausteinen des Gewebes selektiv erhöhen kann. Nach den Ergebnissen sämtlicher in den Tabellen I bis IV aufgeführten Versuche kann man von einer solchen Selektivität kaum sprechen.

Allen Kontrastierungsmitteln war eine besondere Affinität zu nukleinsäurehaltigen Zellbestandteilen wie Kernchromatin, Nukleolus und Ribosomen gemeinsam. Der Kontrast des Nukleolus und der Ribosomen lag meistens über dem des Kernchromatins und nur im Falle der Färbung mit $K_4[Fe(CN)_6]$ bei pH=12 darunter.

Von den Organellen des Zytoplasmas zeigte vor allem der Golgi-Apparat ein starkes Aufnahmevermögen für Metallionen. Er erreichte häufig die Kontrastintensität des Kernchromatins, während Mitochondrien und

Tabelle I: Kontrastverhältnisse an OsO_4-fixierten Schnitten

Verbindung	Jon	Atom-gew.	pH	Konzen-tration	Verhältnis des Kontrastes der Zellkomponenten zum Normkontrast								
					Kchr.	Nukl.	Rib.	Mit.	Sph.	Golgi	Gr. pl.	Membr.	Z. w.
$FeCl_2$	Fe^{2+}	55,85	1,0	1 m	0,33	0,42	0,42	0,16	0,16	0,33	0,08	0,50	0,16
$FeCl_3$	Fe^{3+} u. Komplex	55,85	1,5	1 m	0,50	0,58	0,58	0,25	0,33	0,58	0,16	0,66	0,16
$CoCl_2$	Co^{2+}	58,94	1,5	1 m	0,33	0,42	0,33	0,16	0,16	0,33	0,08	0,50	0,16
$CoCl_2$	$[Co(OH)_4]^{2-}$		12,5	x)	0,16	0,25	0,16	0,16	0,16	0,16	0,08	0,33	0,00
$CoCl_2$	Co^{2+}		1,5	x)	0,33	0,33	0,33	0,16	0,16	0,25	0,08	0,42	0,08
$CuSO_4$	$[Cu(H_2O)_6]^{2+}$	63,54	1,5	1 m	0,33	0,42	0,42	0,08	0,16	0,33	0,08	0,33	0,16
$Cu(NH_3)_4SO_4$	$[Cu(NH_3)_4(H_2O)_2]^{2+}$		12,5	1 m	0,16	0,25	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00

x) Die Hydroxydlösung wurde nach der Vorschrift für Bleihydroxyd nach Watson (109) hergestellt.

Erklärung der Abkürzungen:

Kchr. :	Kernchromatin	Mit. :	Mitochondrien + Plastiden	Gr. pl. :	Grundplasma
Nukl. :	Nukleolus	Sph. :	Sphärosomen	Membr. :	Membranen
Rib. :	Ribosomen	Golgi:	Golgi-Apparat	Z. w. :	Zellwand

Tabelle II: Kontrastverhältnisse an OsO_4-fixierten Schnitten

Verbindung	Jon	Atom-gew.	pH	Konzen-tration	Verhältnis des Kontrastes der Zellkomponenten zum Normkontrast								
					Kchr.	Nukl.	Rib.	Mit.	Sph.	Golgi	Gr. pl.	Membr.	Z. w.
$SnCl_2$	Sn^{2+}	118,7	1,0	1 m	0,33	0,33	0,42	0,16	0,16	0,16	0,00	0,42	0,16
CsCl	Cs^+	132,9	2,5	1 m	0,16	0,33	0,25	0,16	0,16	0,16	0,08	0,33	0,16
CsCl	Cs^+	132,9	12,5	1 m	0,25	0,25	0,33	0,16	0,16	0,16	0,08	0,33	0,16
$BaCl_2$	Ba^{2+}	137,3	3,0	1 m	0,25	0,33	0,33	0,16	0,16	0,25	0,08	0,50	0,16
$BaCl_2$	Ba^{2+}	137,3	12,5	1 m	0,33	0,42	0,33	0,25	0,16	0,25	0,08	0,50	0,25
$HgCl_2$	Hg^{2+}, $[HgCl]^+$	200,6	3,0	0,5 m	0,16	0,16	0,25	0,16	0,16	0,16	0,00	0,25	0,00
Tl_2SO_4	Tl^+	204,4	3,0	0,5 m	0,25	0,33	0,33	0,25	0,25	0,25	0,08	0,33	0,00
$Pb(NO_3)_2$	Pb^{2+}	207,2	2,5	1 m	0,42	0,50	0,50	0,25	0,16	0,25	0,08	0,50	0,16
$Pb(OH)_2$	$[Pb(OH)_2Pb]^{2+}$		12,5	x)	1,00	1,32	1,32	0,50	0,16	0,83	0,16	1,32	0,42
$Bi(NO_3)_3$	Bi^{3+}, BiO^+	209,0	0,5	0,5 m	0,25	0,33	0,33	0,25	0,25	0,25	0,08	0,33	0,08

x) nach Watson

Abkürzungen vergl. Tabelle I

Tabelle III: Kontrastverhältnisse an OsO_4-fixierten Schnitten

Verbindung	Jon	Atom-u. Mol. gew.	pH	Konzentration	Verhältnis des Kontrastes der Zellkomponenten zum Normkontrast							
					Kchr.	Nukl.	Rib.	Mit.	Sph.	Golgi	Gr. pl.	Membr.	Z. w.
$VOSO_4$	VO^{2+} u. komplex	50,95	3,0	1 m	0,50	0,66	0,66	0,25	0,16	0,42	0,08	0,66	0,25
$ZrOCl_2$	ZrO^{2+}	91,22	1,5	1 m	0,42	0,50	0,50	0,33	0,16	0,42	0,08	0,83	0,33
$SbCl_3$	SbO^{+}	121,76	1,5	0,5 m	0,33	0,42	0,42	0,16	0,16	0,33	0,08	0,25	0,16
$Bi(NO_3)_3$	BiO^{+}	209,00	0,5	0,5 m	0,25	0,33	0,33	0,25	0,25	0,25	0,08	0,33	0,08
$UO_2(CH_3COO)_2$	UO_2^{2+} u. Komplex	238,07	3,0	0,5 m	0,66	0,83	0,75	0,42	0,25	0,50	0,08	0,66	0,08
KJ	J^{-}	126,9	4,2	1 m	0,16	0,25	0,16	0,08	0,08	0,16	0,00	0,16	0,16
HJ	J^{-}	126,9	0,5	1 m	0,16	0,16	0,25	0,08	0,08	0,08	0,00	0,16	0,16
Na_2WO_4	WO_4^{2-}	247,8	1,0	1 m	0,33	0,33	0,33	0,25	0,16	0,25	0,08	0,25	0,50
Na_2WO_4	WO_4^{2-}	247,8	12,5	1 m	0,25	0,16	0,25	0,16	0,16	0,16	0,08	0,25	0,42

Abbkürzungen vergl. Tabelle I

Tabelle IV: Kontrastverhältnisse an OsO_4-fixierten Schnitten

Verbindung	Jon	Mol. gew.	pH	Konzentration	Verhältnis des Kontrastes der Zellkomponenten zum Normkontrast							
					Kchr.	Nukl.	Rib.	Mit.	Sph.	Golgi	Gr. pl.	Membr.	Z. w.
Vanadato-molybdat	$3(NH_4)_2O\text{-}2V_2O_5\text{-}4MoO_3\text{-}nH_2O$	1095,4	1,5	x)	0,50	0,66	0,66	0,33	0,25	0,42	0,08	0,66	0,25
$K_4[Fe(CN)]_6$	$[Fe(CN)_6]^{4-}$	211,85	2,0	1m	0,25	0,33	0,33	0,08	0,16	0,25	0,08	0,33	0,16
$K_4[Fe(CN)]_6$	$[Fe(CN)_6]^{4-}$	211,85	12,5	1m	0,16	0,08	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00
$Cu(NH_3)_4SO_4$	$[Cu(NH_3)_4(H_2O)_2]^{2+}$	131,94	12,5	1m	0,08	0,16	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	$[Mo_7O_{24}]^{6-}$	984,9	3,0	0,1m	0,33	0,42	0,33	0,25	0,16	0,25	0,08	0,33	0,16
$H_3[P(W_3O_{10})_4]$	$[P(W_3O_{10})_4]^{3-}$	2756,1	1,0	0,05 m	0,50	0,33	0,42	0,08	0,16	0,16	0,08	0,33	0,66
$H_3[P(W_3O_{10})_4]$	WO_4^{2-}	247,8	12,5	0,05 m	0,25	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,08	0,25	0,42

Abkürzungen vergl. Tabelle I

Sphärosomen meist nur halb so dicht erschienen.

In den Meristemzellen der Wurzelspitzen sind Proplastiden vorhanden. Ihre Morphologie ähnelt jedoch stark jener der Mitochondrien vom Tubuli-Typ mit dem einen Unterschied, daß die Membraneinstülpungen mit fortschreitender Differenzierung nicht senkrecht, sondern parallel zur umgebenden Membran verlaufen. Im frühen Entwicklungsstadium ist eine Unterscheidung zwischen Proplastiden und Mitochondrien sehr schwierig und nach Fixierung mit Glutaraldehyd fast unmöglich. Da sich beide Zellorganellen bei den Kontrastierungsversuchen außerdem völlig gleich verhielten, gelten die folgenden, für Mitochondrien beschriebenen Ergebnisse auch für die Entwicklungsformen der Plastiden.

Nach der Osmiumtetroxydfixierung hob sich das gesamte Membransystem einer Zelle - Plasmalemma, Tonoplast, Mitochondrienmembranen, Membranen des Golgi-Apparates, Endoplasmatisches Retikulum und Kernmembran - mit großer Deutlichkeit vom meist kaum gefärbten Hintergrund ab. Lediglich nach der Behandlung mit dem Kupfertetraaminion war fast keine Membran zu erkennen.

Als einziger Bestandteil des pflanzlichen Gewebes zeigte die Zellwand gegenüber den Salzlösungen ein recht unterschiedliches Verhalten. Während sich die meisten Ionen kaum an sie anlagerten, konnte sie mit Phosphorwolframsäure und Wolframationen stärker als jede andere Komponente kontrastiert werden. Auch Bleihydroxyd verstärkte ihren Kontrast erheblich.

Bei den in den Tabellen I bis IV aufgeführten Ergebnissen war eine direkte Beziehung zwischen dem Atomgewicht der verwendeten Metallionen und der Höhe des Endkontrastes nicht zu beobachten. (Vergleiche Fe^{2+} und Co^{2+} mit Hg^{2+} und Tl^{+}!) Innerhalb einer Ionengruppe mit annähernd gleichen Atomgewichten (Tabelle I und II) konnte jedoch

mit allen Ionen, die sich zu Dimeren und höheren Polymeren in der Lösung vereinigen können - z. B. Fe^{3+} und Pb^{2+} - eine Kontraststeigerung gegenüber den monomeren Ionen erzielt werden. Ein weiterer wichtiger Parameter scheint auch der pH-Wert der Kontrastierungslösung zu sein. Mit Anionen bildete sich der höchste Kontrast im stark sauren pH-Bereich aus und mit Kationen im Bereich zwischen pH=10 und pH=13. Während Anionen jedoch bei basischen pH-Werten kaum mehr zu einer Kontraststeigerung führten, konnten Kationen zwischen pH=7 und pH=1 mit gutem Erfolg verwendet werden.

b) Kontrastierung nach der Fixierung mit Glutaraldehyd

Wie nach der Osmiumtetroxydfixierung führten die verwendeten Metallsalze auch nach der Fixation mit Glutaraldehyd zu keiner selektiven Kontrastierung einer Zellkomponente oder eine Molekülgruppe (Tabellen V bis VIII). Die Nukleinsäure enthaltenden Strukturen traten wiederum besonders deutlich im elektronenoptischen Bild hervor, jedoch zeigte diesmal das Kernchromatin einen höheren Kontrast als Nukleolus und Ribosomen (Abb. 3). Nur nach der Behandlung mit Bleihydroxyd hoben sich die Ribosomen besser vom Hintergrund ab als der Kern.

Golgi-Apparat, Mitochondrien und Sphärosomen erschienen im allgemeinen dichter als nach der Osmiumfixierung, dagegen waren die Membransysteme überhaupt nicht "angefärbt". An ihrer Stelle verliefen helle Linien mit negativem Kontrast durch das weniger ausgelaugte Zytoplasma. Mit Ausnahme des Kobalttetrahydroxyions, des Molybdat- und des Ferrocyanations führten sämtliche Metallionen zu einer Kontraststeigerung der Zellwand, die sich mit Phosphorwolframsäure wiederum am besten kontrastieren ließ.

Der Einfluß der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Metallionen auf die Intensität des Endkontrastes entsprach den Ergebnissen bei der Osmiumtetroxydfixierung (Tabellen I bis IV). Eine direkte Abhängigkeit vom Atomgewicht war nicht zu beobachten. Polymere Ionen ließen die Zellkomponenten dichter erscheinen als monomere. Im basischen pH-Bereich wurden bevorzugt Kationen gebunden. Mit diesen Kationen nahm die Kontrastierbarkeit bei pH-Werten zwischen pH=7 und pH=2 nicht so deutlich ab wie mit Anionen zwischen pH=7 und pH=13.

Bei der Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure konnte im ganzen pH-Bereich immer wieder beobachtet werden, daß die verschiedenen Ultrastrukturen auf einzelnen Schnitten räumlich hervortraten. Das Kernchromatin, der Nukleolus, die Mitochondrien und die Ribosomen erschienen als gleichmäßige, kontrastreiche Einsenkungen, während die proteinreichen Teile des Kerns, die Sphärosomen und das Grundplasma als helle, wolkige Erhebungen zu sehen waren (Abb. 4). Dieser dem "negative staining" vergleichbare Effekt, ließ sich an den glutaraldehydfixierten Schnitten schließlich ständig reproduzieren, wenn das Präparat nach der einstündigen Kontrastierung nur unvollständig gewaschen wurde.

3.) Bestimmung der an der Kontrastierung beteiligten chemischen Gruppen des biologischen Präparates

Die in der Literatur beschriebenen, an isolierten Zellkomponenten und Makromolekülen entwickelten, selektiven Kontrastierungsverfahren führen an ultrahistologischen Schnitten nur selten zu eindeutigen Aussagen. Der Grund hierfür dürfte in der chemischen Komplexität des Gewebeschnittes zu suchen sein. Es ist zu erwarten, daß der Kontrast einzelner Strukturen nicht nur auf dem Vorhandensein einer Molekülgruppe beruht, sondern auch durch die gleichzeitige Affinität verschiedenartiger, nebeneinanderliegender Moleküle für das aufgebrachte Metallion ausgebildet wird.

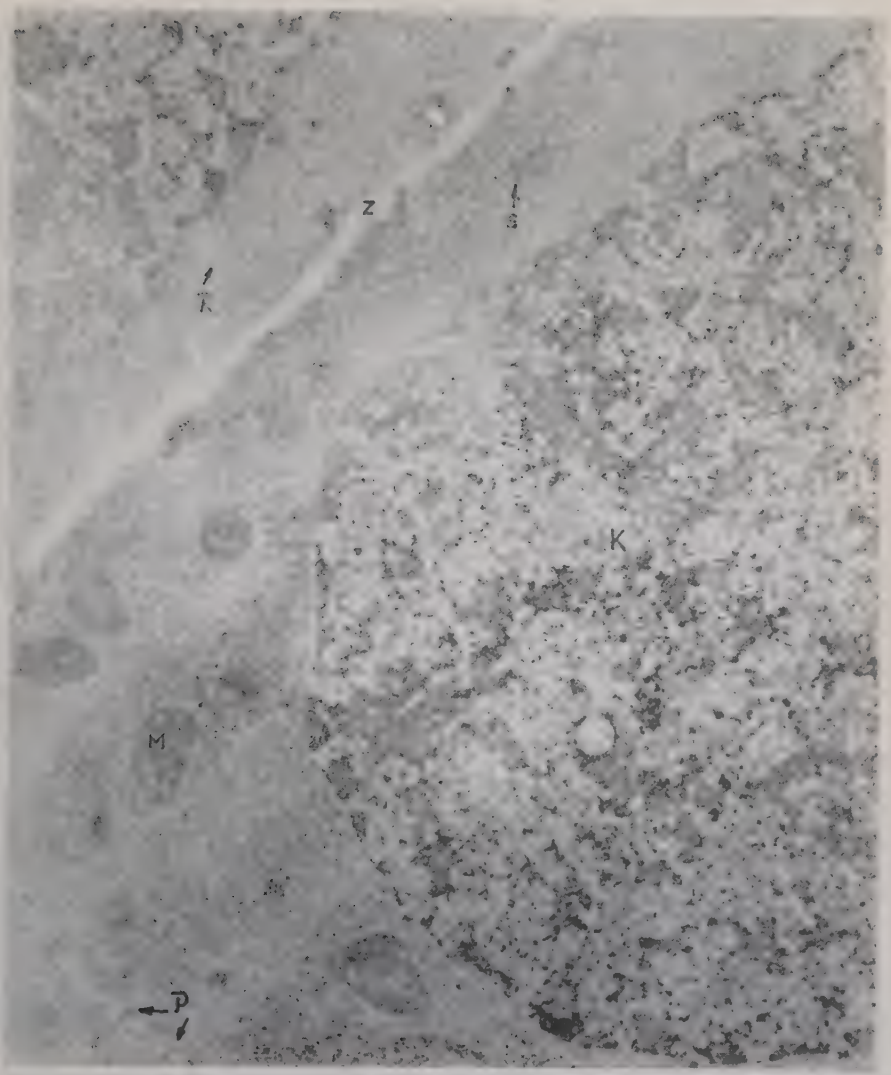


Abb. 3. Meristemzellen der Wurzelspitzen von Allium cepa, fixiert in Glutaraldehyd und kontrastiert mit Uranylacetat in wässeriger Lösung. Vergrößerung x 18 000

K: Kern M: Mitochondrien R: Ribosomen
G: Golgi-Apparat Z: Zellwand P: Plasmodesmen

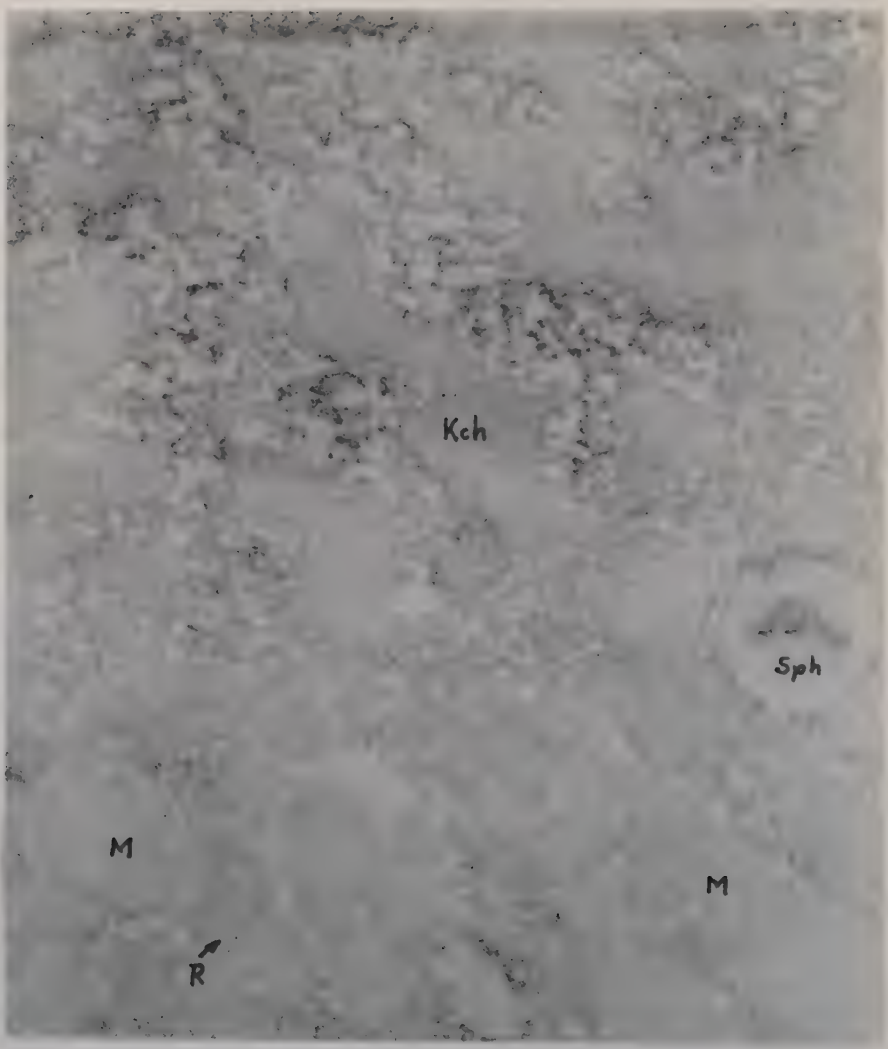


Abb. 4. "Negative staining" Effekt mit Phosphorwolframsäure
Die einzelnen Zellkomponenten treten räumlich auf dem elektronenoptischen Bild hervor.

Sph: Sphärosomen x 48 000

sonstige Abkürzungen siehe Abb. 3

Tabelle V: Kontrastverhältnisse an Glutaraldehyd-fixierten Schnitten

Verbindung	Jon	Atom-gew.	pH	Konzen-tration	Verhältnis des Kontrastes der Zellkomponenten zum Normkontrast							
					Kchr.	Nukl.	Rib.	Mit.	Sph.	Golgi	Gr. pl.	Z. w.
$FeCl_2$	Fe^{2+}	55,85	1,0	1m	0,50	0,33	0,33	0,33	0,25	0,33	0,16	0,33
$FeCl_3$	Fe^{3+} u. Komplex	55,85	1,5	1m	0,66	0,50	0,50	0,33	0,25	0,42	0,16	0,33
$CoCl_2$	Co^{2+}	58,94	1,5	1m	0,50	0,33	0,33	0,25	0,16	0,33	0,16	0,33
$CoCl_2$	$[Co(OH)_4]^{2-}$		12,5	x)	0,16	0,16	0,16	0,08	0,08	0,16	0,08	0,00
$CoCl_2$	Co^{2+}		1,5	x)	0,33	0,33	0,33	0,25	0,16	0,25	0,16	0,25
$CuSO_4$	$[Cu(H_2O)_6]^{2+}$	63,54	1,5	1m	0,33	0,25	0,25	0,25	0,16	0,16	0,16	0,25
$Cu(NH_3)_4SO_4$	$[Cu(NH_3)_4(H_2O)_2]^{2+}$		12,5	1m	0,25	0,16	0,16	0,08	0,08	0,16	0,08	0,08

Abkürzungen vergl. Tabelle I

Tabelle VI: Kontrastverhältnisse an Glutaraldehyd-fixierten Schnitten

Verbindung	Jon	Atom-gew.	pH	Konzen-tration	Verhältnis des Kontrastes der Zellkomponenten zum Normkontrast							
					Kchr.	Nukl.	Rib.	Mit.	Sph.	Golgi	Gr. pl.	Z. w.
$SnCl_2$	Sn^{2+}	118,7	1,0	1m	0,33	0,25	0,25	0,25	0,16	0,16	0,08	0,16
CsCl	Cs^+	132,9	2,5	1m	0,16	0,16	0,16	0,16	0,08	0,08	0,08	0,25
CsCl	Cs^+	132,9	12,5	1m	0,25	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,08	0,16
$BaCl_2$	Ba^{2+}	137,3	3,0	1m	0,25	0,25	0,25	0,16	0,08	0,08	0,08	0,16
$BaCl_2$	Ba^{2+}	137,3	12,5	1m	0,33	0,25	0,25	0,25	0,16	0,25	0,16	0,25
$HgCl_2$	Hg^{2+}	200,6	3,0	0,5m	0,25	0,16	0,25	0,16	0,08	0,16	0,08	0,16
Tl_2SO_4	Tl^+	204,4	3,0	0,5m	0,25	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,08	0,50
$Pb(NO_3)_2$	Pb^{2+}	207,2	2,5	1m	0,50	0,33	0,50	0,25	0,16	0,33	0,08	0,16
$Pb(OH)_2$	$[Pb(OH)_2Pb]^{2+}$		12,5	x)	0,83	0,83	1,00	0,33	0,33	0,83	0,08	0,33
$Bi(NO_3)_3$	Bi^{3+}, BiO^+	209,0	0,5	0,5m	0,42	0,33	0,25	0,25	0,16	0,25	0,08	0,25

x) nach Watson

Abkürzungen vergl. Tabelle I

Tabelle VII: Kontrastverhältnisse an Glutaraldehyd-fixierten Schnitten

Verbindung	Jon	Atomgew. d. Zentral-atoms	pH	Konzen-tration	Verhältnis des Kontrastes der Zellkomponenten zum Normkontrast							
					Kchr.	Nukl.	Rib.	Mit.	Sph.	Golgi	Gr. pl.	Z. w.
$VOSO_4$	VO^{2+} u. Komplex	50,95	3,0	1m	0,66	0,58	0,66	0,25	0,33	0,66	0,16	0,66
$ZrOCl_2$	ZrO^{2+}	91,22	1,5	1m	0,66	0,33	0,33	0,33	0,25	0,25	0,16	0,83
$SbCl_3$	SbO^{+}	121,76	1,5	0,5m	0,33	0,25	0,25	0,25	0,16	0,16	0,16	0,16
$Bi(NO_3)_3$	BiO^{+}	209,00	0,5	0,5m	0,42	0,33	0,25	0,25	0,16	0,25	0,08	0,25
$(UO_2)(CH_3COO)_2$	UO_2^{2+} u. Komplex	238,07	3,0	0,1m	1,00	0,83	0,66	0,50	0,33	0,66	0,16	0,16
KJ	J^{-}	126,9	4,2	1m	0,33	0,33	0,33	0,25	0,16	0,25	0,08	0,16
HJ	J^{-}	126,9	0,5	1m	0,33	0,25	0,25	0,16	0,16	0,25	0,08	0,16
Na_2WO_4	WO_4^{2-}	247,8	1,0	1m	0,50	0,33	0,33	0,25	0,16	0,25	0,08	0,42
Na_2WO_4	WO_4^{2-}	247,8	12,5	1m	0,25	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,08	0,16

Abkürzungen vergl. Tabelle I

Tabelle VIII: Kontrastverhältnisse an Glutaraldehyd-fixierten Schnitten

Verbindung	Jon	Mgw. d. Tons	pH	Konzentration	Verhältnis des Kontrastes der Zellkomponenten zum Normalkontrast							
					Kchr.	Nukl.	Rib.	Mit.	Sph.	Golgi	Gr. pl.	Z. w.
Vanadato-molybdat	$3(NH_4)_2C\text{-}2V_2O_5\text{-}4MoO_3 - nH_2O$	1095,4	1,5	x)	0,83	0,50	0,83	0,25	0,25	0,66	0,16	0,42
$K_4[Fe(CN)]_6$	$[Fe(CN)_6]^{4-}$	211,85	2,0	1m	0,25	0,16	0,25	0,08	0,08	0,16	0,08	0,00
$K_4[Fe(CN)]_6$	$[Fe(CN)_6]^{4-}$	211,85	12,5	1m	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
$Cu(NH_3)_4SO_4$	$[Cu(NH_3)_4(H_2O)_2]^{2+}$	131,94	12,5	1m	0,25	0,16	0,16	0,08	0,08	0,16	0,08	0,08
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	$[Mo_7O_{24}]^{6-}$	984,9	3,0	0,1m	0,50	0,50	0,50	0,16	0,16	0,25	0,16	0,00
$H_3[P(W_3O_{10})]_4$	$[P(W_3O_{10})_4]^{3-}$	2756,1	1,0	0,05 m	0,50	0,50	0,50	0,25	0,16	0,33	0,16	1,16
$H_3[P(W_3O_{10})]_4$	WO_4^{2-}	247,8	12,5	0,05m	0,33	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,08	0,16

Abkürzungen vergl. Tabelle I

Mit Hilfe spezifischer chemischer Reaktionen wurde deshalb versucht, die einzelnen im pflanzlichen Gewebe vorhandenen chemischen Gruppen so zu verändern, daß ihre möglichen Metallbindungsstellen für die Ionenaufnahme blockiert waren. Die Fixierung mit Osmiumtetroxyd erwies sich dafür als ungeeignet, denn die Vielfalt der bei ihr ablaufenden Reaktionen, die oxydative Herauslösung niedermolekularer Bestandteile und die noch nicht geklärte Ablagerung niederer Osmiumoxyde im Gewebe ließen eine schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erwarten.

Nach der Glutaraldehydfixation sollten dagegen alle Moleküle des biologischen Präparates mit Ausnahme der Amino- und Iminogruppen unverändert vorliegen. Es war deshalb mit der Reaktion folgender chemischer Bestandteile der Zellen bei der Kontrastierung zu rechnen:

Amino- und Iminogruppen, die durch das Fixativ nicht vollständig erfaßt worden waren

Sulfhydrylgruppen

Hydroxylgruppen

Kohlenhydrate

Aldehyde und Ketone

Carboxyl-, Sulfonsäure- und Phosphatgruppen

Heterozyklische Molekülsysteme

Um Fehlermöglichkeiten durch das Einbettungsmittel zu vermeiden, wurden die Blockierungsreaktionen an Wurzelmeristemgewebe nach der Fixierung mit Glutaraldehyd und vor der Einbettung in Epon vorgenommen. Von den verschieden behandelten Gewebeblöcken sind Dünnschnitte hergestellt worden, die nach der Kontrastierung mit wässerigen Lösungen von Uranylacetat. Bleihydroxyd, Kobaltchlorid und Phosphorwolframsäure zur Auswertung kamen (Tabellen IX bis XII). Als Kontrollen dienten unbehandelte Schnitte von glutaraldehydfixierten Gewebeblöcken.

a) Blockierung der Carboxyl-, Phosphat- und Sulfonsäuregruppen

Carboxylgruppen (und auch Aldehydgruppen) sollten durch die Hydrierung mit Natriumborhydrid ($NaBH_4$) in Hydroxylgruppen übergeführt werden. Nach der letzten Entwässerungsstufe in 100 % Äthanol kamen die Gewebe zu diesem Zweck für 2 Stunden bei 4°C in Pyridin, das mit Natriumborhydrid gesättigt worden war und anschließend zur Entfernung des überschüssigen Reagenz aus dem Gewebe vor der Einbettung noch zweimal für jeweils 10 Minuten in 100 % Alkohol.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der verschieden kontrastierten Dünnschnitte der so behandelten Zellen zeigten keinen signifikanten Unterschied zum Kontrast der Kontrollen. Mit 0,1 m Salzsäure in 98-prozentigem Methylalkohol konnten in der Lichtmikroskopie (47) und auch in der Elektronenmikroskopie (113) Carboxyl-, Phosphat- und Sulfonsäuregruppen in Geweben blockiert werden. Da die Methylierung der Carboxylgruppen schneller erfolgt als die der Phosphate und diese wiederum schneller als die der Sulfonsäuren, wurden die Gewebeblöcke nach der Entwässerung in 95-prozentigem Äthanol für 2, 6, 24 und 48 Stunden bei 37°C in salzsaurem Methanol inkubiert, anschließend vollständig entwässert und eingebettet. Im Elektronenmikroskop waren von den Zellen, die 48 Stunden behandelt worden waren, nach der Kontrastierung mit Uranylacetat, Bleihydroxyd und Kobaltchlorid nur mehr kontrastlose Flächen zu sehen, in denen hin und wieder die Form des Kernes mehr erahnt als festgestellt werden konnte (Abb. 5). Die Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure führte an allen Zellenkomponenten mit Ausnahme der Zellwand zum gleichen Ergebnis. Die Zellwand schien ihre Affinität für das kontrasterhöhende Polyion durch die Methylierung nur zum Teil eingebüßt zu haben (Tabelle XII, Spalte 3).

Nach einer Blockierungszeit von 2, 6 und 24 Stunden zeigten die einzelnen Zellbestandteile noch mit sämtlichen vier Metallionen eine Kon-

Abb. 5. Ausschnitt einer Meristemzelle nach Methylierung der Säuregruppen des Gewebes und Kontrastierung mit Uranylacetat in wässeriger Lösung.

Z: Zellwand x 48 000

Tabelle IX: Kontrastverhältnisse an Glutaraldehyd-fixierten Schnitten nach Blockierung verschiedener Gruppen und Kontrastierung mit 1/10 m Uranylacetat in H_2O

Blockierung mit	Kontrolle	Methanol -HCl	Methanol -HCl	Phenylhydrazin	Anilin	$NaBH_4$	Essigs. anhydrid	$NaBH_4$+ Essigs. anhydrid	$NaNO_2$	DNFB	$POCl_3$	H_2SO_4
gegen		-COOH -PO_4 -SO_4	hydrolysiert m. NaOH	-C(=O)-H -C(=O)	-C(=O)-H -C(=O)	-C(=O)-H -COOH	-OH -NH_2	-COOH -OH -NH_2 -C(=O)-H	-NH_2	-NH_2 -SH Imidazol	-NH_2 -SH -OH Kohlenhydr.	Kohlenhydr.
Kernchromatin	1,00	0,10	1,00	1,00	0,92	0,92	1,00	0,92	1,00	0,92	1,32	1,00
Kernprotein	0,16	0,08	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,50	0,16
Nukleolus	0,83	0,08	1,00	0,83	0,72	0,83	0,72	0,72	0,83	0,72	1,16	0,83
Ribosomen	0,66	0,08	0,66	0,72	0,66	0,66	0,72	0,83	0,66	0,66	0,83	0,72
Mitochondrien	0,50	0,08	0,66	0,58	0,50	0,42	0,50	0,33	0,42	0,50	1,16	0,66
Golgi-Apparat	0,66	0,08	0,66	0,66	0,66	0,58	0,33	0,33	0,60	0,66	0,83	0,66
Sphärosomen	0,33	0,08	0,33	0,42	0,33	0,25	0,25	0,16	0,33	0,33	0,50	0,33
Grundplasma	0,16	0,08	0,16	0,25	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,50	0,16
Zellwand	0,16	0,08	0,25	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	1,00	0,16
Farbveränderung in den Gewebeblöcken	- x)	-	-	+	+	-	+	+	±	+	+	+

x) Bewertung

- unverändert
+ Farbvertiefung
± zweifelhaft

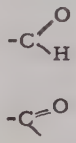
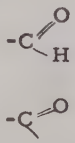
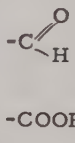
DNFB: Dinitrofluorobenzol

Tabelle X: Kontrastverhältnisse an Glutaraldehyd-fixierten Schnitten nach Blockierung verschiedener Gruppen und Kontrastierung mit Bleihydroxyd nach Watson.

Blockierung mit	Kontrolle	Methanol -HCl	Methanol -HCl	Phenylhydrazin	Anilin	$NaBH_4$	Essigs. anhydrid	$NaBH_4$+ Essigs. anhydrid	$NaNO_2$	DNFB	$POCl_3$	H_2SO_4
gegen		-COOH $-PO_4$ $-SO_4$	hydrolysiert m. NaOH	-C(=O)H -C(=O)	-C(=O)H -C(=O)	-C(=O)H -COOH	-OH $-NH_2$	-COOH -OH $-NH_2$ -C(=O)H	$-NH_2$	$-NH_2$ -SH Imidazol-OH	$-NH_2$ -SH -OH Kohlenhydr.	Kohlenhydr.
Kernchromatin	0,83	0,10	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	1,00	0,83
Kernprotein	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,33	0,08
Nukleolus	0,83	0,08	0,83	0,72	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,72	1,00	0,92
Ribosomen	1,00	0,08	0,92	0,92	1,00	1,00	0,92	0,92	1,00	0,92	1,00	1,08
Mitochondrien	0,33	0,08	0,33	0,25	0,25	0,33	0,25	0,16	0,25	0,33	1,00	1,00
Golgi-Apparat	0,83	0,08	0,83	0,83	0,72	0,72	0,66	0,50	0,72	0,83	0,83	0,83
Sphärosomen	0,33	0,08	0,33	0,33	0,25	0,25	0,25	0,16	0,33	0,25	0,50	0,50
Grundplasma	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,33	0,16
Zellwand	0,33	0,08	0,25	0,25	0,33	0,25	0,16	0,08	0,33	0,33	0,66	1,00
Farbveränderung in den Gewebeblöcken	-	-	-	+	+	-	+	+	±	+	+	+

Abkürzungen vergl. Tabelle IX

TabelleXI : Kontrastverhältnisse an Glutaraldehyd-fixierten Schnitten nach Blockierung verschiedener Gruppen und Kontrastierung mit 1/10 m Kobaltchlorid in H_2O

Blockierung mit	Kontrolle	Methanol -HCl	Methanol -HCL	Phenylhydrazin	Anilin	$NaBH_4$	Essigs. anhydrid	$NaBH_4$+ Essigs. anhydrid	$NaNO_2$	DNFB	$POCl_3$	H_2SO_4
gegen		-COOH $-PO_4$ $-SO_4$	hydrolysiert m. NaOH				-OH $-NH_2$	-COOH -OH $-NH_2$ 	$-NH_2$	$-NH_2$ -SH Imidazol	$-NH_2$ -SH -OH Kohlenhydr.	Kohlenhydr.
Kernchromatin	0,50	0,10	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,66	0,50
Kernprotein	0,16	0,08	0,16	0,16	0,16	0,16	0,08	0,08	0,16	0,16	0,33	0,16
Nukleolus	0,33	0,08	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,25	0,33	0,33	0,66	0,42
Ribosomen	0,33	0,08	0,33	0,42	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,25	0,50	0,33
Mitochondrien	0,25	0,08	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,16	0,33	0,25	0,66	0,50
Golgi-Apparat	0,33	0,08	0,33	0,33	0,33	0,33	0,25	0,25	0,33	0,33	0,50	0,33
Sphärosomen	0,16	0,08	0,16	0,16	0,16	0,16	0,08	0,08	0,16	0,16	0,33	0,33
Grundplasma	0,16	0,08	0,16	0,16	0,16	0,08	0,16	0,08	0,16	0,16	0,33	0,16
Zellwand	0,33	0,08	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,08	0,25	0,25	0,66	0,42
Farbveränderung in den Gewebeblöcken	-	-	-	+	+	-	+	+	$\pm$	+	+	+

Abkürzungen vergl. Tabelle IX

Tabelle XII: Kontrastverhältnisse an Glutaraldehyd-fixierten Schnitten nach Blockierung verschiedener Gruppen und Kontrastierung mit 0,05 m Phosphorwolframsäure in H_2O.

Blockierung mit	Kontrolle	Methanol -HCl	Methanol -HCl	Phenylhydrazin	Anilin	$NaBH_4$	Essigs. anhydrid	$NaBH_4$+ Essigs. anhydrid	$NaNo_2$	DNFB	$POCl_3$	H_2SO_4
gegen		-COOH $-PO_4$ $-SO_4$	hydrolysiert m. NaOH	-C(=O)H -C(=O)	-C(=O)H -C(=O)	-C(=O)H -COOH	-OH $-NH_2$	-COOH -OH $-NH_2$ -C(=O)H	$-NH_2$	$-NH_2$ -SH -OH Imidazol	$-NH_2$ -SH -OH Kohlenhydr.	Kohlenhydr.
Kernchromatin	0,50	0,10	0,50	0,50	0,42	0,42	0,50	0,50	0,50	0,42	0,50	0,66
Kernprotein	0,16	0,08	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,25	0,16
Nukleolus	0,50	0,08	0,50	0,50	0,50	0,42	0,42	0,42	0,50	0,42	0,50	0,58
Ribosomen	0,50	0,08	0,50	0,42	0,50	0,50	0,50	0,42	0,50	0,50	0,50	0,58
Mitochondrien	0,25	0,08	0,16	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,33	0,33
Golgi-Apparat	0,33	0,08	0,33	0,25	0,33	0,33	0,33	0,33	0,25	0,25	0,33	0,33
Sphärosomen	0,16	0,08	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
Grundplasma	0,16	0,08	0,08	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
Zellwand	1,16	0,92	1,08	1,00	1,00	1,08	1,08	1,00	1,16	1,16	0,42	1,16
Farbveränderung in den Gewebeblöcken	-	-	-	+	+	-	+	+	±	+	+	+

Abkürzungen vergl. Tabelle IX

trastierbarkeit. Ohne Bevorzugung einer Struktur nahm sie jedoch proportional zur Zeit ab. Diese gleichmäßige Verringerung der "Färbbarkeit" sowohl der nukleinsäurehaltigen als auch der übrigen Zellstrukturen mit verschiedenen Metallionen ließ darauf schließen, daß für die Kontrastausbildung vor allem eine Säuregruppe und zwar die Phosphatgruppe verantwortlich ist.

Durch Behandlung der Ultradünnschnitte des methylierten Gewebes mit 0,1 n NaOH während 60 Minuten konnten die gebildeten Methylester wieder gespalten werden. Die Kontrastierbarkeit aller Zellkomponenten nahm proportional der Einwirkungszeit der Natronlauge wieder gleichmäßig zu, wobei die Zellwand früher als die übrigen Ultrastrukturen ihren Maximalkontrast erreichte (Abb. 6). Mit Uranylacetat konnte nach der Verseifung am Nukleolus und an den Mitochondrien eine größere Kontraststeigerung beobachtet werden als in den Kontrollen (Tabelle IX, Spalte 3).

b) Blockierung der Reaktionsfähigkeit von Carbonylgruppen

Das Meristemgewebe wurde nach der Glutaraldehydfixation und anschliessend an den Waschvorgang für 3 Stunden bei 60°C mit einer Lösung aus 10 ml Phenylhydrazin, 20 ml Eisessig und 70 ml destilliertem Wasser behandelt. Die vorliegenden Carbonylgruppen sollten dabei unter Bildung von Phenylhydrazonen blockiert werden (Vergleiche 13). Nach Einwirkung einer 10-prozentigen Anilinlösung in Eisessig während einer Stunde bei 20°C war die gleiche Minderung der Kontrastierungsreaktion der Carbonyle zu erwarten. Es zeigte sich jedoch, daß die Kontrastierbarkeit weder nach der Phenylhydrazin- noch nach der Anilinblockade in signifikanter Weise verändert worden war (Tabellen IX bis XII, vierte und fünfte Spalte, Abb. 7).

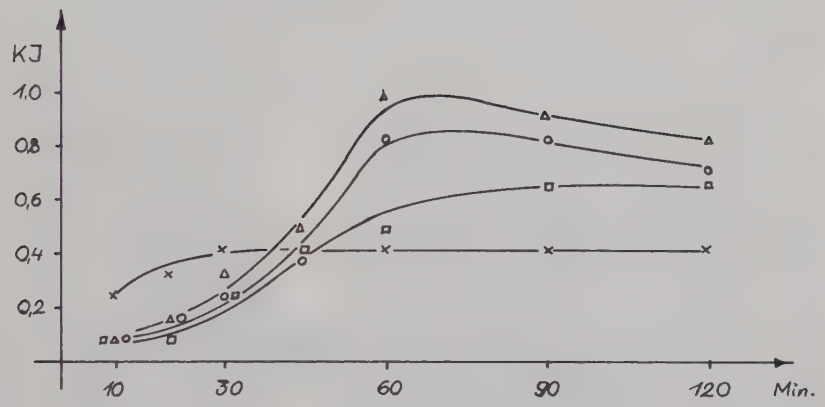


Abb. 6. Zunahme des Kontrastes (KJ) einiger Zellkomponenten bei der Hydrolyse der Methylester mit wachsender Einwirkungsdauer der NaOH.

△ Kernchromatin

○ Nukleolus

□ Mitochondrien

× Zellwand

Abb. 7. Ausschnitt einer Meristemzelle nach Blockierung der Aldehyd- und Ketongruppen des Gewebes und Kontrastierung mit Bleihydroxyd.

V: Vakuole x 48 000

sonstige Abkürzungen siehe Abb. 3

c) Blockierung von Aminogruppen

Verschiedene Autoren wiesen darauf hin (47), daß die Fixierung mit Aldehyden bei den in der Histologie angewandten Fixierungszeiten und Konzentrationen nur selten alle möglichen Aldehydbindungsstellen des Gewebes erfaßt. Aus diesem Grunde mußte bei der Kontrastierung auch mit der Beteiligung nichtbesetzter Aminogruppen gerechnet werden. Diese Aminogruppen lassen sich jedoch mit Hilfe von salpetriger Säure in Hydroxylgruppen umwandeln. Die fixierten Gewebeblöcke wurden deshalb 24 und 48 Stunden lang bei 4°C in einer frisch angesetzten 2,5-prozentigen Lösung von Natriumnitrit in 5-prozentiger Essigsäure inkubiert. Nach der Behandlung mit den Metallionen konnte gegenüber den Kontrollschnitten keine Änderung der Kontrastierbarkeit der Zellbestandteile festgestellt werden.

d) Gleichzeitige Blockierung Hydroxyl- und Aminogruppen

Hydroxylgruppen können durch Einwirkung von 40 % Essigsäureanhydrid in Pyridin, das mit einer Spur wasserfreiem Natriumacetat als Katalysator versetzt ist, während 12 Stunden bei Zimmertemperatur acetyliert werden. Mit Aminogruppen bilden sich dabei Säureamide (110).

Der Kontrast der Ultradünnschnitte war nach der "Färbung" mit Uranylacetat, Kobaltchlorid und Phosphorwolframsäure unverändert. Mit Bleihydroxyd konnte dagegen am Golgi-Apparat und an der Zellwand nicht mehr die Kontrastintensität der Kontrollpräparation erreicht werden.

Wie unter a) beschrieben ist, werden durch Natriumborhydrid die Carboxylgruppen zu Hydroxylgruppen hydriert. Diese können nun wiederum mit Essigsäure verestert werden. Watson und Aldridge (110) versuchten mit diesen Reaktionen die Kontrastierbarkeit sämtlicher Zellkomponenten mit Ausnahme der Nukleinsäuren zu unterdrücken. Die beiden Verfah-

ren werden dazu unter Zwischenschaltung eines Waschvorganges in Pyridin nacheinander durchgeführt.

In eigenen Versuchen konnten an den Dünnschnitten des so behandelten Gewebes nach der Kontrastierung folgende Veränderungen festgestellt werden:

Mit Phosphorwolframsäure war nur die Zellwand etwas weniger gut "angefärbt". Dieselbe Kontrastminderung trat auch mit Kobaltchlorid und Bleihydroxyd auf; beide Ionen wurden zudem kaum mehr an das Zytoplasmaprotein gebunden (Abb. 8). Die Kontrastierbarkeit der Mitochondrien und der Sphärosomen mit Uranylacetat, Bleihydroxyd und Kobaltchlorid nahm zwar ab, wurde jedoch nicht vollständig eliminiert.

e) Gleichzeitige Blockierung von Amino-, Sulfhydryl-, phenolischen Hydroxyl- und Imidazolgruppen

Dinitrofluorobenzol (DNFB) reagiert in alkoholischer Lösung mit Amino-, Sulfhydryl-, phenolischen Hydroxyl- und Imidazolgruppen (13). Zur Umsetzung dieser Molekülarten wurde das fixierte und mit 95-prozentigem Alkohol entwässerte Zwiebelgewebe für 48 Stunden bei Zimmertemperatur in einer Lösung von 1 % DNFB in 95-prozentigem Alkohol, der 0,01m NaOH enthielt, inkubiert, anschließend mit 100-prozentigem Äthanol gewaschen, vollständig entwässert und eingebettet.

Die Kontrastierungen der davon hergestellten Ultradünnschnitte mit Uranylacetat, Bleihydroxyd, Kobaltchlorid und Phosphorwolframsäure zeigten keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollen. (Tabelle XII, Spalte 10).

f) Einführung neuer Phosphatgruppen unter gleichzeitiger Blockierung von Sulfhydryl-, Hydroxyl- und Aminogruppen

Bei dem Versuch der Methylierung der in der Pflanzenzelle vorhandenen Säuregruppierungen wurde bereits erwähnt, daß der größte Teil des im elektronenoptischen Bild auftretenden Kontrastes wahrscheinlich auf der Affinität von Phosphorsäureverbindungen für die einzelnen Metallionen beruht. Nach der Einführung von PO_4-Gruppen mit Hilfe von Phosphoroxitrichlorid mußte an Struktureinheiten, die Sulfhydryl-, Amino- und Hydroxylgruppen enthalten durch Metallkationen ein höherer Kontrast als in den Kontrollen erwartet werden. Besonders kohlenhydratreiche Zellkomponenten sollten hervorstechend kontrastierbar werden. In der lichtmikroskopischen Histologie kommen 1,5-prozentige Lösungen von Phosphorylchlorid in Pyridin zur Anwendung. Gewebe, die mit dieser Konzentration über 3 Stunden bei 60°C behandelt worden waren, erwiesen sich jedoch als völlig ungeeignet zur Herstellung von Ultradünnschnitten. Gute Ergebnisse konnten dagegen mit einer Lösung von 0,5 % $POCl_3$ in reinem Pyridin erzielt werden. Die Reaktionszeit mußte dabei auf eine Stunde bei 60° beschränkt werden.

Nach der Kontrastierung der Schnitte mit Uranylacetat, Bleihydroxyd und Kobaltchlorid zeigten sämtliche Gewebebestandteile eine stark vermehrte Kontrastierbarkeit. Die höchste Zunahme wies die Zellwand nach der Behandlung mit Uranylacetat auf. (Tabellen IX bis XI, Spalte 11). Mit Phosphorwolframsäure ließ sich nur am Kernprotein und den Mitochondrien eine sehr leichte, fast insignifikante Kontrasterhöhung feststellen. Die mit dem Polyion sonst gut darstellbare Zellwand hatte deutlich an Kontrast verloren.

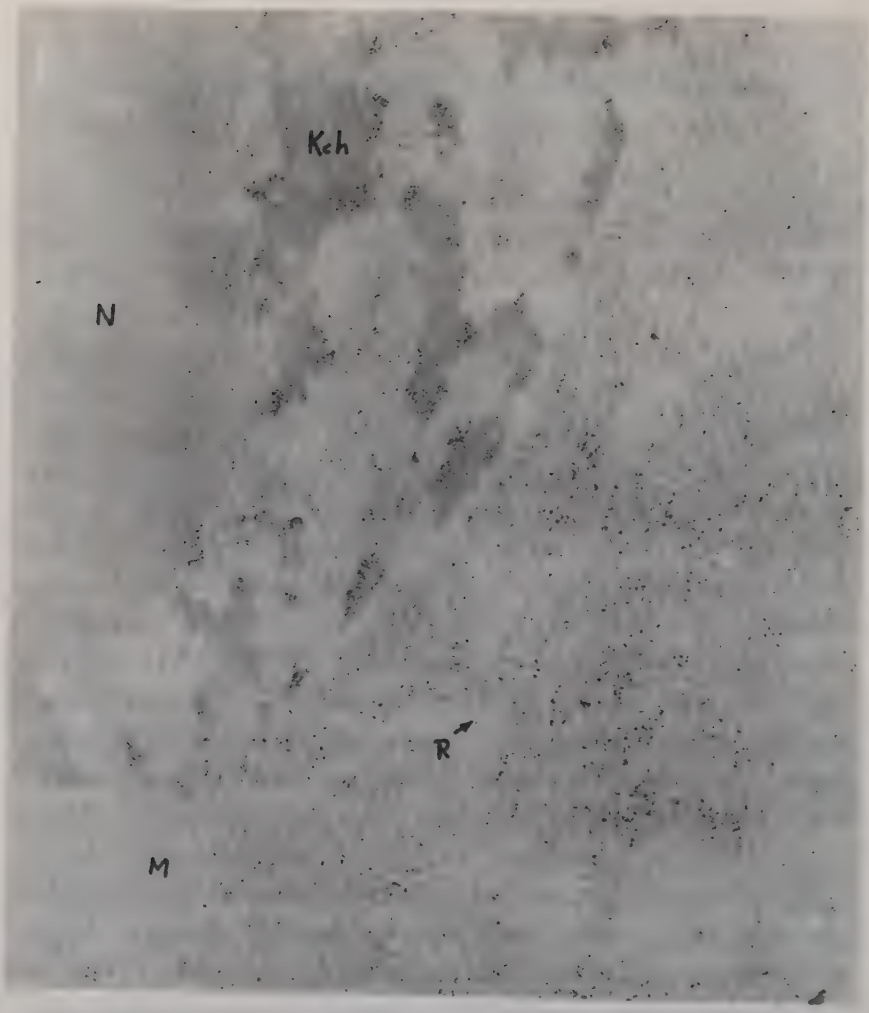


Abb. 8. Ausschnitt einer Meristemzelle nach Blockierung der Aldehyd-, Carboxyl-, Hydroxyl- und Aminogruppen mit $NaBH_4$ und Essigsäurehydrid. Durch die Kontrastierung mit Bleihydroxyd lassen sich nur noch nukleinsäurehaltige Zellkomponenten darstellen.

x 48 000

Abkürzungen siehe Abb. 3

g) Einführung von Schwefelsäuregruppen in Kohlenhydrate

Die Hydroxylgruppen der Kohlenhydrate können nicht nur mit Phosphorsäuregruppen sondern auch mit Schwefelsäure verestert werden (47). Zur Einführung der Sulfongruppen wurde das Meristemgewebe nach der Fixation völlig entwässert und für eine Stunde bei Zimmertemperatur in einer Lösung von 20 % konzentrierter (=98 %) Schwefelsäure in Diäthyläther inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in 100 % Äthanol während jeweils 10 Minuten wurden die Gewebeblöcke eingebettet.

Im Elektronenmikroskop war nach der Behandlung der Schnitte dieses Gewebes mit Phosphorwolframsäure keine bezeichnende Veränderung des Kontrastes gegenüber jenem der Kontrollen zu bemerken. Mit Uranylacetat und Kobaltchlorid als Kontrastierungsmittel ließen sich die Mitochondrien und die Sphärosomen besser als in den Kontrollen hervorheben. Dieser Effekt trat besonders deutlich nach der "Färbung" mit Bleiionen auf (Abb. 9). Die einzelnen Zellstrukturen erschienen dabei stark granuliert und die Zellwand zeigte einen dreimal höheren Kontrast als in den Kontrollen (Tabelle X, Spalte 12).

h) Kontrastierung der nach a) bis g) behandelten Gewebe mit alkoholischen Salzlösungen

Die verschiedenen Metallsalze werden zur Kontrastierung von ultrahistologischen Schnitten nicht nur in wässerigen Lösungen verwendet sondern sehr häufig auch in organischen Lösungsmitteln, in welchen die elektrolytische Dissoziation der chemischen Bausteine der Zellen und der Metallsalze wesentlich geringer als in Wasser ist. Außerdem können die Metallionen in einer anderen Ionenform vorliegen und die Bildung von Komplexen aus Metallion und den Molekülen der Ultrastrukturen kann begünstigt werden.

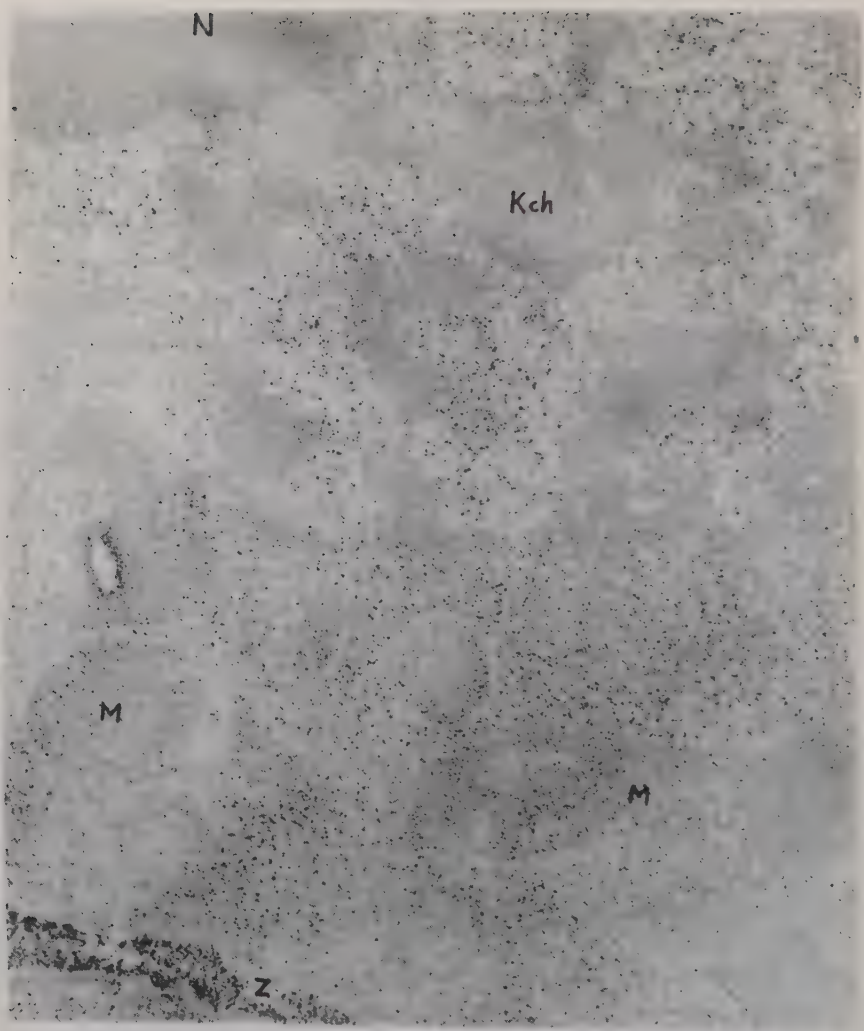


Abb. 9. Ausschnitt aus einer Meristemzelle nach Behandlung des Gewebes mit konzentrierter Schwefelsäure in Äther und Kontrastierung mit Bleihydroxyd. Die Mitochondrien und die Zellwand gewinnen gegenüber den Kontrollen an Kontrast.

x 48 000

Abkürzungen siehe Abb. 3

Um Aussagen über die Voraussetzungen und die Vorgänge bei der Kontrastierung von ultrahistologischen Schnitten mit nichtwässerigen Salzlösungen machen zu können, wurden Dünnschnitte, die von den nach a) bis g) behandelten Meristemgeweben gewonnen worden waren, mit einer 0,1 m Uranylacetatlösung in 100-prozentigem Methylalkohol während einer Stunde bei Zimmertemperatur kontrastiert. Das an den Netzen hängende überschüssige Kontrastierungsmittel ließ sich durch kurzzeitiges, mehrmaliges Eintauchen der Objektträger in reines Methanol entfernen ohne daß der Kontrast abnahm.

Der Unterschied in den Kontrastierfähigkeiten einer wässerigen und einer methanolischen Lösung trat bereits beim Vergleich der Kontrollschnitte deutlich hervor. Die Ribosomen, die Mitochondrien und die Sphärosomen hoben sich nach Behandlung mit Uranylacetat im organischen Lösungsmittel wesentlich kontrastreicher auf dem elektronenoptischen Bild ab als nach der Kontrastierung mit Uranylionen im wässerigen Medium (Tabelle XIII, Spalte 1).

Aldehyde und Ketone schienen auch bei diesem "Färbeverfahren" für die Bindung von Metallionen nicht verantwortlich zu sein. Ebensowenig ließ sich eine Beteiligung von Hydroxyl-, Amino- und Sulfhydrylgruppen nachweisen.

Nach der Einführung der Phosphorgruppe in die chemischen Bausteine des Gewebes konnte wieder ein starkes Ansteigen der Kontrastierbarkeit aller Ultrastrukturen beobachtet werden, nach der Veresterung der Kohlenhydrathydroxyle mit Schwefelsäure dagegen nur an den Plasmaproteinen und an der Zellwand. Die übrigen Zellbestandteile hatten gegenüber den Kontrollen und gegenüber den Ergebnissen nach der Anwendung einer wässerigen Salzlösung sogar an Kontrast verloren.

Die Annahme, daß bei der Kontrastierung glutaraldehydfixierter Zellen

Tabelle XIII: Kontrastverhältnisse an Glutaraldehyd-fixierten Schnitten nach Blockierung verschiedener Gruppen und Kontrastierung mit Uranylacetat in Methanol

Blockierung mit	Kontrolle	Methanol -HCl	Methanol -HCl	Phenylhydrazin	Anilin	$NaBH_4$	Essigs. anhydrid	$NaBH_4$+ Essigs. anhydrid	$NaNO_2$	DNFB	$POCl_3$	H_2SO_4
gegen		-COOH $-PO_4$ $-SO_4$	hydrolysiert m. NaOH	-C(=O)H -C(=O)	-C(=O)H -C(=O)	-C(=O)H -COOH	-OH $-NH_2$	-COOH -OH $-NH_2$ -C(=O)H	$-NH_2$	$-NH_2$ -SH Imidazol	$-NH_2$ -SH -OH Kohlenhydr.	Kohlenhydr.
Kernchromatin	1,00	1,00	1,00	1,00	1,08	1,00	1,08	1,00	1,00	0,92	1,33	0,83
Kernprotein	0,16	0,16	0,25	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,33	0,25
Nukleolus	0,83	0,83	0,83	0,92	0,83	0,83	0,72	0,83	0,83	0,83	1,33	0,50
Ribosomen	0,83	0,83	0,83	0,83	0,72	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	1,00	0,50
Mitochondrien	0,83	0,83	0,83	0,92	0,83	0,83	0,72	0,72	0,72	0,72	1,33	0,33
Golgi-Apparat	0,66	0,58	0,66	0,72	0,66	0,66	0,66	0,58	0,66	0,58	0,83	0,50
Sphärosomen	0,66	0,66	0,66	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,66	0,66	0,72	0,50
Grundplasma	0,16	0,08	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,33	0,25
Zellwand	0,16	0,08	0,08	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,66	0,25
Farbveränderung in den Gewebeblöcken	-	-	-	+	+	-	+	+	±	+	+	+

Abkürzungen vergl. Tabelle IX

mit einer methanolischen Uranylacetatlösung die Bildung von Komplexen tatsächlich eine hervorragende Rolle spielt, wird vor allem durch das Kontrastierungsergebnis an jenen Dünnschnitten gestützt, deren Säuregruppen mit Methanol verestert worden waren. Sämtliche Zellkomponenten entwickelten den gleichen Kontrast wie die Kontrollen und die Dünnschnitte, deren Methylester durch NaOH gespalten worden waren. Um zu beweisen, daß die Esterbindung durch Einwirkung von Methanol nicht gelöst wird, wurden Dünnschnitte des blockierten Materials als Kontrolle bis zu 2 Stunden bei Zimmertemperatur mit Methanol und anschließend mit einer wässerigen Uranylacetatlösung behandelt. An keiner Zellstruktur bildete sich ein Kontrast aus.

Diese Fähigkeit der Kontrastierung von Ultradünnschnitten unter Umgehung der Säuregruppierungen ist nicht auf das Uranylion beschränkt. Mit einer Lösung von Kobaltchlorid in 90-prozentigem Methanol ließen sich die Zellorganellen in den nach a) behandelten Geweben ebenfalls darstellen. Der Übergang von 100-prozentigem Methylalkohol zu 90-prozentigem war notwendig, da Kobaltchlorid in reinem Alkohol nicht das rosa Co^{2+}-Ion bildet sondern einen blauen Anionenkomplex $[CoCl_4]^{2-}$ Lösungen, die diesen an der Farbe kenntlichen Komplex enthielten, kontrastierten die veresterten Zellbestandteile nicht. Durch Zusatz von 10 % Wasser schlägt die Farbe der Lösung in rosa um, d. h. das Ancion $[CoCl_4]^{2-}$ ist in Co^{2+} und $4Cl^-$ zerfallen und das Co^{2+} Kation führt zur Kontrastierung der Zellstrukturen.

Die Kontrastierung mit Uranylacetat und mit Kobaltchlorid in wässeriger Lösung wurde bei pH=3,5 bzw. bei pH=1,5 vorgenommen. In diesem pH-Bereich war zum Teil mit einer Protonisierung der Sauerstoff- und Stickstoffatome an und in den Heterozyklen zu rechnen, die die Komplexbildung zwischen Metallion und Ringsystem hemmte. Um pH=7,0 sollte die Protonisierung weitgehend zurückgedrängt sein und auch an den Dünnschnitten des blockierten Gewebes sollte sich ein Kontrast

ausbilden. Er konnte jedoch nicht beobachtet werden, so daß den spezifischen physikalisch-chemischen Eigenschaften des Lösungsmittels Methanol bei der Kontrastierung methylierter Zellstrukturen eine große Bedeutung zuzukommen scheint.

4.) Durchführung der Blockierungsreaktionen an Ultradünnschnitten

In der lichtmikroskopischen Histologie werden die unter 3) beschriebenen spezifischen Blockierungsreaktionen zum Nachweis der chemischen Bausteine des Gewebes verwendet und meistens an den vom Einbettungsmittel - in vielen Fällen Paraffin - befreiten Mikrotomschnitten durchgeführt. Auch in der elektronenmikroskopischen Ultrahistologie wäre es wünschenswert, wenn die verschiedenen Reaktionen an Serienschnitten der gleichen eingebetteten Zelle und nicht vor der Einbettung an verschiedenen Gewebeblöcken anzuwenden wären. Es besteht dabei die Möglichkeit, daß die besondere chemische Organisation einer Ultrastruktur besser erkannt werden kann, als wenn die den Kontrastmittelwert bestimmenden Einzelergebnisse zwar an Dünnschnitten des gleichen Gewebes, doch an verschiedenen Zellen gewonnen wurden.

Außer Methacrylat läßt sich kein Einbettungsmittel der Elektronenmikroskopie ohne Schädigung der Ultrastrukturen aus den Dünnschnitten extrahieren. Es mußte deshalb untersucht werden, ob die Blockierungsreaktionen auch mit den auf den Kupfernetzen aufgenommenen Schnitten die gleichen Ergebnisse erbringen wie mit den uneingebetteten Blöcken.

Die Serienschnitte wurden von glutaraldehydfixierten, in Epon eingebetteten Meristemzellen gewonnen, auf befilmte Trägernetze aufgenommen und in verschließbaren Wägegläschen den gleichen unter 3) beschriebenen Reaktionen ausgesetzt. Die Behandlung mit salpetriger Säure, mit Schwefelsäure und mit Phosphorylchlorid unterblieb wegen der zu befürchtenden Zerstörung der Kupfernetze. Als Kontrastierungs-

mittel sind wiederum Uranylacetat, Bleihydroxyd, Kobaltchlorid und Phosphorwolframsäure in wässeriger Lösung verwendet worden.

In 60 % der Versuche wurden die an fixierten, uneingebetteten Meristemzellen gewonnenen Ergebnisse auch mit dieser Methode erreicht. An den Dünnschnitten der restlichen 30 % zeigten sich besonders nach der Behandlung mit Pyridin häufig Teile der verschiedenen Organellen im Negativkontrast. Dieser Effekt ließ auf eine Herauslösung der biologischen Strukturen durch das organische Lösungsmittel schließen. Schnitte, die nur in reinem Pyridin inkubiert wurden, zeigten die gleichen Erscheinungen. Sie konnten durch Verkürzung der Einwirkungsdauer auf die Häfte der angegebenen Zeit weitgehend vermieden werden.

Daß nicht nur das Lösungsmittel sondern auch der Polymerisationsgrad des Epoxyharzes für die Extraktionsvorgänge von Bedeutung ist, zeigte sich bei den Versuchen der Veresterung von Säuregruppen mit Methanol. Die Bildung der Methylester war nach spätestens 24 Stunden abgeschlossen. Nach 12 Stunden ließ sich nur noch das Kernchromatin kontrastieren (Abb. 10). Wurden Schnitte nach vollständiger Blockade der Säuregruppen mit NaOH behandelt, die Methylester also gespalten, so traten der Nukleolus und die Ribosomen mit negativem Kontrast hervor. Die RNS dieser Zellstrukturen war durch die im Methanol vorhandene Salzsäure herausgelöst worden, denn in Kontrollschnitten, die nur in Methanol inkubiert worden waren, konnten Nukleolus und Ribosomen positiv kontrastiert werden. Die Extraktion der RNS ging umso schneller vor sich, je weicher, d. h. je niedriger der Vernetzungsgrad des Epoxyharzes war.

Abb. 10. Nach der Behandlung von Ultradünnschnitten glutaraldehyd-fixierter Zellen während 15 Stunden mit Methanol/HCl ist nur noch das Kernchromatin mit Bleihydroxyd kontrastierbar

x 48 000

5.) Komplexbildung zwischen Metallionen und chemischen Bausteinen der Zellen und ihre Verwendung zur selektiven Kontrastierung einzelner Gruppen

a) Theoretische Überlegungen

Aus den Versuchen 3h) geht hervor, daß die Metallionen des Kontrastierungsmittels nicht nur durch eine reine Ionen-Ionen-Reaktion in Form einer Salzbildung an den zellulären Ultrastrukturen gebunden werden, sondern daß mit der Bildung von Komplexen am Ultradünnschnitt zu rechnen ist. Das Charakteristikum eines jeden aus Zentralatom und organischen Liganden bestehenden Komplexes ist seine Bildungs- oder Stabilitätskonstante K, die für jede Konzentration der beteiligten Moleküle und Ionen das Verhältnis der freien zu den im Komplex vereinigten Einzelgliedern angibt.

In der Kontrastierung ultrahistologischer Schnitte dienen die fest an die zellulären Strukturen fixierten Molekülgruppen als Liganden. Auf Grund ihrer differenzierten chemischen Zusammensetzung und ihrer verschiedenen räumlichen Organisation sollten die Stabilitätskonstanten der aus DNS, RNS oder den anderen Bausteinen des Gewebes mit dem kontrastierenden Metallion gebildeten Komplex deutlich unterschieden sein. Die Größenordnung dieser spezifischen Konstanten muß sich in folgender Weise bestimmen lassen:

Durch die im Überschuß vorliegenden Metallionen ist am Ende der Kontrastierung die maximal mögliche Anzahl ultrastrukturgebundener Liganden besetzt. Werden die Präparate nun in reines Wasser gebracht, die überschüssigen Metallionen also aus dem Komplexbildungsgleichgewicht entfernt, so wird die Komplexbildung rückläufig, bis sich zwischen Schnitt und der entstehenden Lösung das von der Stabilitätskon-

stanten bestimmte Gleichgewicht aus Komplex, unbesetzten Liganden und freien Metallionen eingestellt hat. Komplexe mit sehr kleinen Stabilitätskonstanten können dabei fast völlig zerfallen, einzelne Ultrastrukturen also allein durch Wässern der Präparate ihren Kontrast verlieren.

Bei großen Stabilitätskonstanten ist die Kontrastabnahme einer Ultrastruktur minimal. Die Verhältnisse ändern sich jedoch, sobald die Präparate nach der Kontrastierung nicht mehr in destilliertes Wasser sondern in die Lösung eines Komplexbildners gebracht werden, dessen Stabilitätskonstante mit dem kontrastierenden Metallion größer ist als die des Ion-Ultrastruktur-Komplexes. Die bestimmenden Faktoren für den anschließend noch vorhandenen Kontrast sind dann nicht mehr allein Konzentration und Stabilitätskonstante des gebundenen Komplexes sondern ebenso Konzentration und Bildungskonstante des gelösten Komplexbildners.

b) Experimentelle Prüfung

Für die experimentelle Prüfung dieser Überlegungen wurden wiederum Schnitte von glutaraldehydfixierten und in Epon eingebetteten Meristemzellen verwendet. Ihre Kontrastierung erfolgte während einer Stunde bei Zimmertemperatur in 0,1 m wässerigen Lösungen von Uranylacetat, Eisen-III-chlorid und Kobalt-II-chlorid, sowie mit Bleihydroxyd nach Watson. Nach der Kontrastierung kamen die Netze zur Entfernung der überschüssigen Salzlösung für 15 Sekunden in destilliertes Wasser und anschließend zum Trocknen auf Filtrierpapier. Die Differenzierung der einzelnen gebundenen Komplexe ist pro Objektträger in 1 ml einer Lösung eines wasserlöslichen Komplexbildners bzw. in reinem H_2O vorgenommen worden. Alle weiteren Angaben sind aus den Tabellen XIV bis XVII zu entnehmen. Zum Vergleich der Stabilitätskonstanten (log k) siehe (10, 72 und 85).

Wie aus den Tabellen XIV und XV hervorgeht, besaßen die an den ultrahistologischen Schnitt gebundenen Fe III und Co II Komplexe eine niedri-

gere Stabilitätskonstante als die entsprechenden Verbindungen mit 8-Hydroxychinolin (log k = 9,60 bzw. 9,80). Nach 10 Minuten hatte sich das Gleichgewicht in der Lösung eingestellt. Eine selektive Dekontrastierung war selbst bei Ligandenkonzentrationen um 10^{-5} m nicht zu beobachten.

An Schnitten, die mit Bleihydroxyd kontrastiert worden waren, zeigte der Kernchromatin-Blei-Komplex eine geringere Stabilität als die übrigen gebundenen Bleikomplexe. Er konnte bereits mit 10^{-3} m Zitronensäure (log k = 5,72) "entfärbt" werden. Die Dekontrastierung des ganzen Gewebes war konzentrationsabhängig (Abb. 11).

Mit Äthylendiamintetraessigsäure ließ sich nach der Kontrastierung mit Uranylacetat das Kernchromatin selektiv entfärben. Sein Kontrast nahm während der ersten zehn Minuten der AeDTE-Behandlung kontinuierlich bis zu einem Grenzwert ab (Abb. 12). Die Kontrastminderung an den sonstigen Zellkomponenten war minimal und konnte mit AeDTE-Konzentrationen bis zu 4 m nicht signifikant beeinflußt werden. In Abb. 13 ist die Konzentrationsabhängigkeit der Dekontrastierung des Kernchromatins dargestellt, sie ist wie jede Komplexbildung pH-abhängig.

Mit der Abnahme des Kontrastes des Kernchromatins wurden im Kern kleine Partikel in der Größe der Ribosomen sichtbar. Sie lagen am Rand der Chromatinstrukturen und über das ganze Interchromatin verstreut. Auch der Nukleolus scheint aus ihnen zu bestehen. In den übrigen Zellorganellen wie Mitochondrien, Sphärosomen und Golgi-Apparat konnte keine der "Entfärbung" des Chromatins gleichlaufende Kontrastabnahme und Differenzierung beobachtet werden (Abb. 14 und 15).

Durch Wässern der Ultradünnschnitte ließ sich nach keiner Kontrastierung eine Differenzierung der Ultrastruktur-Metallkomplexe durchführen. Der Konstrast nahm jeweils nur um insignifikante Bruchteile ab.

Tabelle XIV: Bestimmung der Stabilitätskonstanten ($\log K_2$) der am Ultradünnschnitt nach Kontrastierung mit $FeCl_3$ ausgebildeten Komplexe mit verschiedenen löslichen Komplexbildnern.

Komplexbildner	$\log K_2$	Einwirkungszeit 10 min			Einwirkungszeit 30 min		
		Konzentration			Konzentration		
		10^{-3} m	10^{-1} m	1 m	10^{-3} m	10^{-1} m	1 m
Glykokollsäure	4,70	-	-	-	-	-	-
Zitronensäure	6,30	-	-	-	-	-	-
8-Hydroxychinolin	9,60	+	+ x)	n. d.	+	+ x)	n. d.
Salicylamid	10,02	+	+	+	+	+	+
5-Sulfosalicylsäure	14,64	+	+	+	+	+	+
AeDTA	25,10	+	+	+	+	+	+

x) gesättigte Lösung von 8-Hydroxychinolin
n. d. : nicht durchgeführt
AeDTA: Äthylendiamintetraessigsäure

+: Kontrastminderung an allen Zellstrukturen
-: keine Kontrastminderung
$\pm$: selektive Kontrastabnahme

Tabelle XV: Bestimmung der Stabilitätskonstanten ($\log K_2$) der am Ultradünnschnitt nach Kontrastierung mit $CoCl_2$ ausgebildeten Komplexe mit verschiedenen löslichen Komplexbildnern.

Komplexbildner	$\log K_2$	Einwirkungszeit 10 min			Einwirkungszeit 30 min		
		Konzentration			Konzentration		
		10^{-3}m	10^{-1}m	1m	10^{-3}m	10^{-1}m	1m
Glycin	4,95	-	-	-	-	-	-
Picolinsäure	5,90	-	-	-	-	-	-
Histidin	7,30	-	-	-	-	-	-
Serin	8,00	-	-	n. d.	-	-	n. d.
8-Hydroxychinolin	9,80	+	+ x)	n. d.	+	+ x)	n. d.
Äthylendiamin-N,N-diessigsäure	11,78	+	+	+	+	+	+
AeDTA	16,10	+	+	+	+	+	+

Abkürzungen vergl. Tabelle XIV

Tabelle XVI: Bestimmung der Stabilitätskonstanten (log K_2) der am Ultradünnschnitt nach Kontrastierung mit $Pb(OH)_2$ ausgebildeten Komplexe mit verschiedenen löslichen Komplexbildnern

Komplexbildner	log K_2	Einwirkungszeit 10 min			Einwirkungszeit 30 min		
		Konzentration			Konzentration		
		10^{-3}m	10^{-1}m	1m	10^{-3}m	10^{-1}m	1m
Methionin	4,40	-	-	-	-	-	-
Zitronensäure	5,72	±	+	+	±	+	+
Histidin	6,84	+	+	+	+	+	+
Dimethylglyoxim	7,30	+	+	+	+	+	+
Gluthathion	10,60	+	+	+	+	+	+
Cystein	12,20	+	+	+	+	+	+
Weinsäure	14,50	+	+	+	+	+	+
AeDTA	18,30	+	+	+	+	+	+

Abkürzungen vergl. Tabelle XIV

Tabelle XVII: Bestimmung der Stabilitätskonstanten ($\log K_2$) der am Ultradünnschnitt nach Kontrastierung mit Uranylacetat ausgebildeten Komplexe mit verschiedenen löslichen Komplexbildnern

Komplexbildner	$\log K_2$	Einwirkungszeit 10 min			Einwirkungszeit 30 min		
		Konzentration			Konzentration		
		10^{-3} m	10^{-1} m	1m	10^{-3} m	10^{-1} m	1m
Sulfosalicylsäure	3,89	-	-	-	-	-	-
Salicylamid	6,40	-	-	n. d.	-	-	n. d.
8-Hydroxychinolin	8,68	-	- x)	n. d.	-	- x)	n. d.
AeDTA		$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$

Abkürzungen vergl. Tabelle XIV

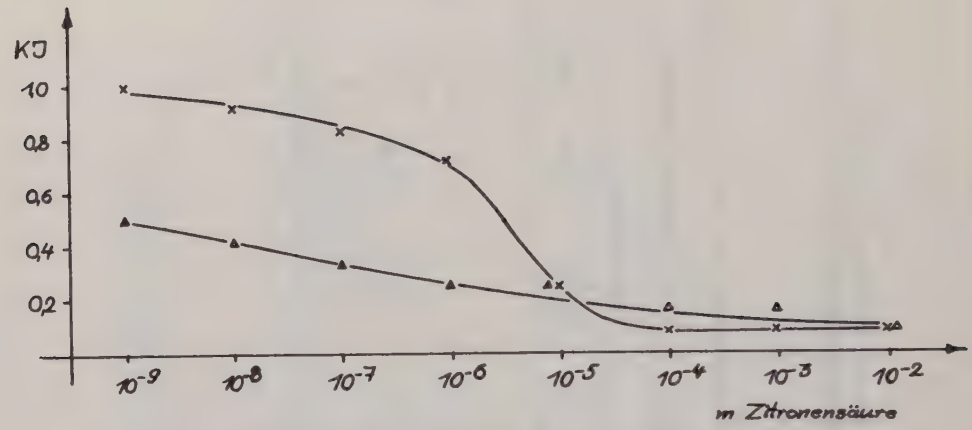


Abb. 11. Abhängigkeit des beobachtbaren Kontrastes (KJ) des Kernchromatins (△) und der Ribosomen (x) von der Konzentration der Zitronensäurelösung nach Kontrastierung mit $Pb(OH)_2$.

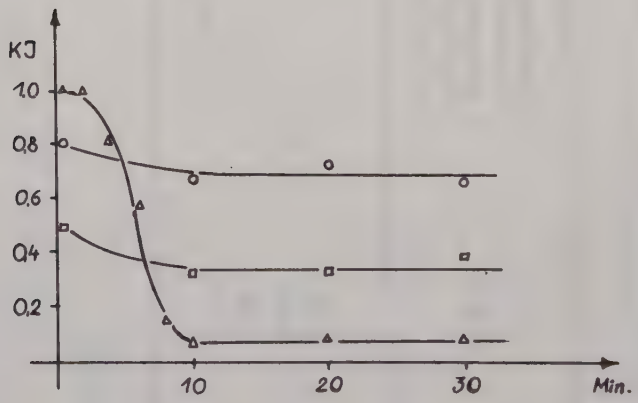


Abb. 12. Zeitabhängigkeit der Dekontrastierung einzelner Zellkomponenten mit 0,25 m AeDTA nach Kontrastierung mit Uranylacetat.

KJ Verhältnis des beobachtbaren Kontrastes zum Normkontrast

△ Kernchromatin

○ Nukleolus

□ Mitochondrien

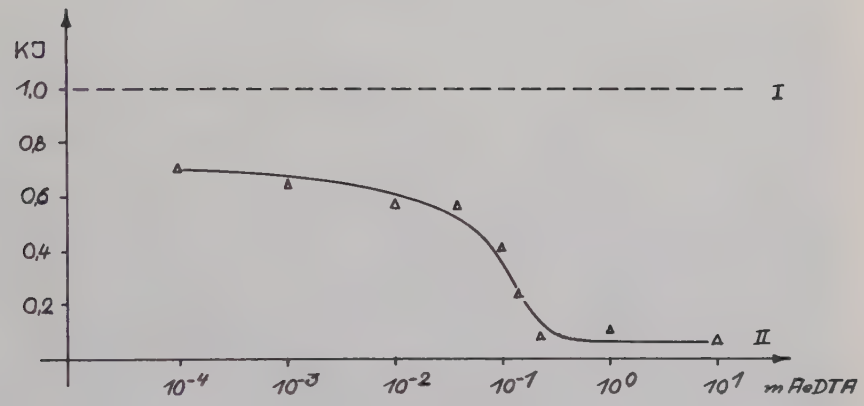


Abb. 13. Abhängigkeit des beobachtbaren Kontrastes (KJ) des Kernchromatins von der Konzentration der AeDTA-Lösung nach Kontrastierung mit Uranylacetat.

I: Kontrast am Schnitt ohne Behandlung mit AeDTA
II: Kontrast am Schnitt bei Behandlung mit AeDTA

Abb. 14. Ausschnitt aus einer glutaraldehydfixierten und mit Uranylacetat kontrastierten Meristemzelle nach Behandlung mit einer 0,25 m AeDTA-Lösung während 6 Minuten. Das Kernchromatin (Kch) hat den größten Teil seines Kontrastes verloren, während die übrigen Zellkomponenten den gleichen Kontrast wie in den Kontrollen aufweisen. (Vergleiche Bild 1)

x 48 000

Abkürzungen siehe Abb. 3

Abb. 15. Behandlung einer mit Uranylacetat kontrastierten Meristemzelle während 10 Minuten mit einer Lösung von 0,25 m AeDTA.

Die Stellen, an denen das Kernchromatin liegt erscheinen leer. Gleichzeitig treten im Kern RNS-haltige Partikel deutlich hervor.

x 48 000

Abkürzungen siehe Abb. 3

D) BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Bei der Kontrastierung ultrahistologischer Schnitte für die Elektronenmikroskopie sind zwei Faktoren von entscheidender Bedeutung: Zum ersten die elektronenstreuende Wirkung des kontrastierenden Metallions und zum zweiten sein Verhalten gegenüber dem makromolekularen chemischen Gerüst der pflanzlichen oder tierischen Zelle. Während die elektronenstreuende Wirkung der einzelnen Elemente auf Grund theoretischer Überlegungen und pyhsikalischer Experimente weitgehend überschaubar ist, können bis jetzt nur ungenaue Aussagen über ihre Affinität zu den Zellstrukturen gemacht werden, denn die wenigen an isolierten Makromolekülen gewonnenen Ergebnisse sind nur bedingt auf die komplexe Molekülanordnung im eingebetteten Gewebe übertragbar.

Zur Deutung der an ultrahistologischen Schnitten erzielten Kontrastierungsergebnisse ist es notwendig, die quantitative chemische Zusammensetzung der einzelnen Zellkomponenten und die Veränderung ihrer Strukturmoleküle während der Präparation zu kennen. So setzt sich der Kern der Pflanzenzellen aus 14 Gewichtsprozent Desoxyribonukleinsäure (DNS) 12,1 % Ribonukleinsäure (RNS), 22,6 % basischen und 51,3 % nicht basischen Proteinen zusammen (36). Andere Verbindungen wie z. B. Lipide liegen nur in unbedeutenden Mengen vor. Die basischen Proteine - Protamine und Histone - sind reich an Lysin, Histidin und Arginin und bilden zusammen mit den Nukleinsäuren die Nukleoproteine. Dagegen kommen die nicht basischen Proteine als eigene Phase nukleinsäurefrei im Kern vor. Das Kernchromatin enthält fast 100 % der gesamten in der Zelle vorhandenen DNS. Geringe Mengen wurden nur noch im Nukleolus (84), im Stroma der Chloroplasten (76, 102) und in den Mitochondrien festgestellt.

Die im Kern enthaltene RNS liegt zu 80 % in den sogenannten Kernkörperchen, den Nukleoli und nur zu 20 % zwischen dem Kernchromatin.

Es wird diskutiert, daß die RNS auch im Kern und Nukleolus an ribosomenartige Strukturen gebunden ist. (29, 35). Den gewichtsmäßig größten Teil des Nukleolus, nämlich 70 % des Trockengewichtes stellen stark basische Proteine dar.

Von der gesamten, in einer Zelle vorhandenen RNS, finden sich 80 - 90 % im Zytoplasma an den Ribosomen. Sie bestehen zu etwa 50 % aus RNS. Bei den restlichen 50 % ihres Trockengewichtes handelt es sich in erster Linie um Strukturproteine, deren Aminosäurezusammensetzung einen hohen Anteil an Arginin, Glutaminsäure und Lysin aufweist (46).

Eine geringe Menge RNS läßt sich auch in den Chloroplasten und ebenfalls in den Mitochondrien nachweisen, deren chemische Analyse Stafford an Erbsenkeimlingen durchführte (100). Er fand 35 - 40 % Protein, 0,5 - 1 % RNS und 30 % Phospholipide. Die Proteine und Lipide kommen in den Mitochondrien nicht getrennt vor, sondern als Lipoproteinkomplexe, in welchen die sauren Gruppen der Phospholipide an basische Proteine gebunden sind (41).

Eine weitere Zellorganelle, der Golgi-Apparat, findet sich in besonders großer Anzahl in Sekretions- und Meristemzellen. Er besteht aus mehreren halbkreisförmigen konzentrisch angeordneten Doppelmembranen und soll an der Synthese polymerer Kohlenhydrate und besonders der Hemizellulosen beteiligt sein (114).

Wie in vielen Pflanzenzellen treten auch in den Zellen der Wurzelspitzen von Allium Sphärosomen auf. Sie enthalten 40 % Lipide und 60 % Proteine, die besonders reich an aromatischen Aminosäuren sind. Viele Autoren sehen sie ähnlich den in tierischen Zellen vorkommenden Lysosomen als Enzymspeicher an (4).

Die einzelnen Organellen liegen in der Zelle eingebettet in ein lichtmikroskopisch homogenes Grundplasma. Elektronenmikroskopisch lassen sich jedoch je nach Fixierung feine Granula aufzeigen. Es handelt sich dabei möglicherweise um Proteinmakromoleküle. Eine genaue chemische Analyse des unstrukturierten Teils des zytoplasmatischen Raumes konnte bis jetzt nicht durchgeführt werden, da die isolierten Zellfraktionen immer Anteile der Doppelmembransysteme des Endoplasmatischen Retikulums enthalten. Weitere Membransysteme der Pflanzenzelle sind Plasmalemma und Tonoplast. Nach dem Modell der "unit membrane" bestehen sie aus einer Lipiddoppelschicht, deren hydrophobe Enden einander zugekehrt und deren polare Gruppen durch Proteine besetzt sind. Der Tonoplast fungiert als semipermeable Begrenzung der Vakuolen im zytoplamatischen Raum, während das Plasmalemma die Zelle zur Zellwand hin abschließt.

Die Zellwand selbst ist äußerst komplex aufgebaut. An die nach der Zellteilung synthetisierte Mitellamelle, die im wesentlichen aus Ca- und Mg-Pektaten besteht, lagern sich zu beiden Seiten die Primärwände an. Sie enthalten im trockenen Zustand 53 % Hemizellulosen, 5 % Pektine, 30 % Zellulose, 5 % Proteine sowie 7 % Lipide und können bei vollständiger Quellung 100 % ihres Gewichtes an Wasser aufnehmen (99). In ausdifferenzierten Geweben folgen auf die Primärwand die einzelnen Anlagerungsschichten der Sekundärwand, deren Gehalt an Hemizellulosen mit steigender Ordnungszahl abnimmt, während sich der Anteil der eingelagerten Zellulose ständig erhöht.

Die größten Veränderungen erfahren die chemischen Bausteine der Zellorganellen bei der Präparation des Pflanzengewebes für die Elektronenmikroskopie während der Fixierung. So wird durch die Osmiumtetroxydfixierung an Doppel- und Dreifachbindungen in Fetten, Wachsen und Molekülen mit einer Sterinstruktur Osmium angelagert. Alkoholische Hydroxylgruppen und Aldehyde werden zu Carbonsäuren oxydiert, ter-

tiäre Amine und freie Aminoendgruppen oxydativ eliminiert und aus Sulfhydrylgruppen, sulfidischem Schwefel (Cystin, Methionin), verschiedenen Heterozyklen und aromatischen Verbindungen mit mindestens 2 Hydroxylgruppen in günstiger Position bilden sich zusammen mit OsO_4 Komplexverbindungen. Unverändert bleiben Carbonsäuren, Paraffinketten, Peptidbindungen, Sulfonsäuregruppen, einwertige Phenole, Zucker und ihre Polymere wie Stärke und Glykogen, Pektine, Aminozucker, Zuckerphosphate und nach Bahr (7) auch Nukleinsäuren.

Ein großer Teil der Proteine wird während der Fixierung durch die Pufferlösung extrahiert (64). Dagegen sind die Lipidstrukturen der Membransysteme mit ihrem hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren nach OsO_4-Behandlung sehr gut erhalten. Man nimmt an, daß sie Osmium über Sauerstoffbrücken direkt am Ort der Mehrfachbindungen in den Fettsäuren oder niedere Osmiumoxyde als Endprodukte der Oxydationsreaktion an den mit den polaren Gruppen verbundenen Proteinen enthalten. Die reduzierten Osmiumoxyde finden sich nach der Fixierung auch im Kernchromatin.

Im Gegensatz zu Osmiumtetroxyd stabilisiert die Fixierung mit Glutaraldehyd besonders die Proteinkomponenten der Zelle, während die nichtfixierten Lipide durch die in der Entwässerung verwendeten lipophilen Lösungsmittel herausgelöst werden und die Stellen, an denen die Membransysteme lokalisiert sind, im elektronenoptischen Bild leer erscheinen. Die Aldehyde greifen vor allem an den seitenständigen Amino- und Iminogruppen der Polypeptide an und bilden Bindeglieder zwischen den einzelnen Ketten. Glutaraldehyd kann als Dialdehyd auch mit Hydroxylgruppen in Polyalkoholen reagieren (47).

Als Folge der Eliminierung der basischen Seitengruppen der Proteine sowohl während der Osmium- als auch bei der Glutaraldehydfixierung muß mit dem Überwiegen der negativen Ladungen in den Gewebestrukturen der ultrahistologischen Schnitte gerechnet werden. Aus den Kontrastierungser-

gebnissen der Tabellen I bis VIII ist zu ersehen, daß dies nach beiden Fixierungen tatsächlich der Fall ist, denn die verschiedenen Zellorganellen lassen sich besonders gut mit Kationen darstellen. Soweit der pH-Wert der Lösung von pH=1 nach pH=13 verändert werden konnte ohne daß ein schwerlösliches Hydroxyd ausfiel, wie z. B. mit CsCl- und $BaCl_2$-Lösungen, ließ sich dabei an den Ultradünnschnitten eine Kontrastzunahme feststellen. Die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren und die Carboxylgruppen des übrigen Gewebes sind bereits im sauren pH-Bereich im beträchtlichen Maße dissoziiert und damit zur Bindung von Kationen befähigt. Ihre volle Dissoziation erreichen sie jedoch erst im basischen Bereiche.

Die als Anionen zur Kontrastierung verwendeten Metalle (z. B. WO_4^{2-}) führten um pH=1 zur größten Kontraststeigerung. Wie die Kontrastabnahme beim Übergang vom Co^{2+}-Kation zum $[Co(OH)_4]^{2-}$ Anion und die geringe Affinität der Zellorganellen für WO_4^{2-} bei pH=12,5 zeigen, können diese Anionen aus alkalischen Lösungen nur schlecht gebunden werden. Durch die Protonisierung der in den Heterozyklen der nukleinsäurehaltigen Strukturen in besonders hohem Maße vorliegenden tertiären Stickstoffatome entstehen dagegen um pH=1 auch in dem von basischen Seitenketten entblößten Gewebe noch so viele positive Ladungen, daß ein Ansteigen der Kontrastierbarkeit mit Anionen möglich ist (Vergleiche auch die Kontrastabnahme der $K_4[Fe(CN)_6]$-"Färbung" von pH=2 zu pH=12,5).

Die Charakterisierung der negativen Ladungen und die Bestimmung des Kontrastanteils, den sie durch Bindung von Kationen verursachen, läßt sich für glutaraldehydfixierte Zellen mit den Ergebnissen der Blockierungsreaktionen durchführen. Wenn die an den Gewebeblöcken nach der Behandlung mit spezifischen Blockierungsagentien zu beobachtenden Farbveränderungen als Indikator für einen positiven Reaktionsverlauf angesehen werden können, müssen Hydroxyl-, Amino-, Sulfhydryl-, Aldehyd- und Ketongruppen in den Pflanzenzellen blockiert worden sein. In den entsprechenden Ultradünnschnitten war jedoch nach Kontrastierung mit

wässerigen Lösungen von UO_2-acetat, $Pb(OH)_2$, $CoCl_2$ und Phosphorwolframsäure kein signifikanter Kontrastabfall zu beobachten, während die Blockierung der Carboxyl-, Phosphat- und der Sulfonsäuregruppen zu einem vollständigen Verlust der Kontrastierbarkeit führte. Im gleichen Sinne konnten nach der Einführung neuer Phosphat- und Schwefelsäureradikale die Zellstrukturen mit den Metall-Kationen stärker als im unbehandelten Zustand kontrastiert werden.

Die an den einzelnen Ultrastrukturen während der Blockierung mit den Phosphorsäure-, Schwefelsäure- und Carboxylgruppen gebildeten Methylester weisen eine unterschiedliche Stabilität auf. Bei der Hydrolyse der Ester mit n/10 NaOH nimmt die Kontrastierbarkeit der verschiedenen Zellorganellen mit Ausnahme der Zellwand jedoch in analoger, vollständig paralleler Weise zu. Dieses Verhalten läßt darauf schließen, daß in den Zellkomponenten ein und dieselbe Säuregruppe den Methylester ausgebildet hat. Da der Hydrolyseverlauf der an Phosphaten reichen Nukleinsäurestrukturen parallel dem der anderen Organellen liegt, kann es sich nur um die Phosphorsäuregruppe handeln.

Die Kontrastierbarkeit der Zellwand nimmt während der Hydrolyse wesentlich schneller zu als die der übrigen Untereinheiten des Gewebes. Es darf daher angenommen werden, daß dies auf die leichte Spaltbarkeit von Carboxyl-Methylestern zurückzuführen ist.

Watson und Aldridge (110) geben ein Verfahren zur selektiven Kontrastierung von Nukleinsäuren an, wobei sie durch Hydrierung mit $NaBH_4$ Aldehyde und Carboxylgruppen in Alkohole überführen und diese mit Essigsäureanhydrid verestern. Zwischen Aminogruppen und dem Säureanhydrid bildet sich gleichzeitig eine Amidbindung aus. In den so behandelten Geweben liegen also wiederum hauptsächlich die Makromoleküle mit Phosphatgruppen aufnahmebereit für die Metallionen vor. Die Ergebnisse eigener Versuche zeigten, daß sich durch die Eliminierung der Carboxyle

aus der Kontrastierungsreaktion zwar der Kontrast der Zellwand, der Mitochondrien, des Golgi-Apparates, der Sphärosomen und des Grundplasmas mit den verschiedenen Metallionen nicht mehr so stark wie an den Kontrollen ausbildet, daß diese Zellorganellen aber trotzdem noch kontrastierbar sind. Nach der Folgerung von Watson und Aldridge könnte der Restkontrast auf dem Vorhandensein von Nukleinsäuren beruhen. Viel wahrscheinlicher hat er seine Ursache jedoch in der Anwesenheit von phosphorsäurehaltigen Makromolekülen wie z. B. Phospholipoproteinen.

Die Kontrastierung ultrahistologischer Schnitte scheint nicht nur als reine Ionenreaktion in Form einer Salzbildung zu verlaufen, sondern unter Einbeziehung nicht-ionisierter Molekülgruppen auch als Komplexbildung. Für das Vorkommen von Komplexen spricht vor allem die gute Kontrastierbarkeit der Zellorganellen mit alkoholischen Uranylacetat- und Kobaltchloridlösungen nach vollständiger Veresterung aller Säuregruppen des Gewebes (Siehe z. b. Tabelle XIII). Die Möglichkeit einer Beeinflussung der Esterbindung durch das Methanol konnte durch eine zweistündige Behandlung der Schnitte mit Methanol und dem vergeblichen Versuch anschließend mit wässerigen Salzlösungen einen Kontrast zu erzielen, ausgeschaltet werden.

Auf die Art der an der Komplexbildung beteiligten Strukturmoleküle der Zelle wird noch einzugehen sein.

Neben der Ionenadsorption und der Komplexbindung existiert noch eine dritte Möglichkeit der Kontrastierung von ultradünnen Schnitten. Sie beruht offenbar nicht auf dem chemischen Bau sondern auf der physikalischen Struktur der Zellbestandteile und wurde als "negative-staining" in der Ultrahistologie zum ersten Mal von Lippert (63) diskutiert. Er vermutet, daß nach der Aldehydfixierung vor allem die Nukleinsäurehaltigen Zellorganellen eine poröse und inhomogene Struktur besitzen,

in welche die Kontrastierungsflüssigkeit eintritt und bei ungenügendem Spülen der Schnitte als eine in der Konzentration schnell zunehmende Lösung eintrocknet. Bei der Kontrastierung der Gewebeschnitte mit Phosphorwolframsäure konnte in eigenen Versuchen festgestellt werden, daß sie nicht nur in nukleinsäurehaltige Kernbestandteile und Ribosomen sondern auch in Mitochondrien eingelagert wird. Die Proteine des Kerns, des Grundplasmas und auch die Sphärosomen heben sich dagegen als helle, unkontrastierte, wolkige Strukturen im Bild ab (vergl. Abb. 4). Es ist wahrscheinlich, daß auch der Kontrast der aus Mikrofibrillen aufgebauten Zellwand in ähnlicher Weise zustande kommt. Sie zeigt jedenfalls unter normalen Färbebedingungen mit Phosphorwolframsäure und Wolframationen bereits einen fibrillären Aufbau mit stark granulierten, elektronendichten Anlagerungen.

Das Verhalten der Zellwand während der Kontrastierung läßt sich durch den "negative-staining" Effekt allein nicht beschreiben, sondern nur im Zusammenhang mit der Auswirkung der Ladung ihrer Strukturmoleküle. So kann mit dem Anion der Phosphorwolframsäure ihr höchster Kontrast bei pH=1 und ein Minimum der Elektronenstreuung bei pH=12,5 erzielt werden. Das freie Bleikation färbt sie am intensivsten bei pH=12,5. Die Ursache für dieses Verhalten darf in der Dissoziation der Galakturonsäuregruppen der Pektine und den Acetylseitengruppen der Hemizellulosen gesehen werden, welche bei pH=1 ihr Minimum und um pH=12 ihr Maximum erreicht. Als weiterer Beweis für die Ladungsabhängigkeit der Kontrastierung mag zudem die Färbbarkeit nach Einführung von Phosphat-und Sulfatgruppen an die Hydroxyle der Kohlenhydrate gelten: Phosphorwolframsäure wird nicht mehr so gut und Kationen werden besser als in den Kontrollen gebunden.

Aus der getrennten Betrachtung der Elektroadsorption in wässerigen und der Bindung über Nebenvalenzen in alkoholischen Lösungen als mögliche Ursachen für die Besetzung der Zellstrukturen mit kontrasterhöhenden

Metallionen darf nicht der Eindruck entstehen, daß beide Mechanismen nur streng voneinander getrennt auftreten. Tatsächlich wirken sie bei der Kontrastierung in jedem Lösungsmittel zusammen. Das nachweisbare, zeitweilige Überwiegen einer Bindungsart kann an Hand der Eigenschaften der Strukturmoleküle und der Metallionen gedeutet werden.

Die am Ultradünnschnitt bei der Kontrastierung entstehenden Metallkomplexe lassen sich aller Wahrscheinlichkeit nach am ehesten den Innerkomplexsalzen zuordnen. Sie können sich in allen Fällen bilden, in denen das Ion irgendeines Metalles mit Molekülen reagiert, die einerseits eine Gruppe enthalten, deren Wasserstoff es ersetzen kann, andererseits eine Gruppe, die sich nebenvalent an das gegebene Metallion anlagert. Die Substitution des Wasserstoffs läßt sich an Carboxyl-, enolischen Hydroxyl-, Phosphat-, Sulfonsäure-, Oxim- und an der primären und sekundären Aminogruppe durchführen. Zu den Gruppen, die sich mit dem Metallion nebenvalent verbinden können, zählen Carboxyle, alkoholische Hydroxyle, der Schwefel der Thioäther und der Thioketone, substituierte Imine, die tertiäre Aminogruppe, der trivalente Stickstoff der Heterozyklen sowie die Azogruppen und ebenfalls die Oximgruppe und die primären und sekundären Amine. Ordnet man die einzelnen Koordinationsgruppen nach abnehmender Affinität zu den Metallionen, so ergibt sich folgendes Bild:

$$-O^- \rangle -NH_2 \rangle -N{=}N- \rangle \overset{\diagdown}{\underset{\|}{N}} \rangle -COO^- \rangle -O- \gg \overset{|}{C}{=}O$$

Die Vielfalt der mit den verschiedenen Metallen möglichen Innerkomplexe wird durch eine gewisse Spezifität einzelner Metallionen gegenüber den unterschiedlichen zur Koordination befähigten Gruppen eingeschränkt. Nach Martell und Calvin (72) lassen sich die Metalle entsprechend ihrer Affinität zum Sauerstoff oder Stickstoff der Liganden in drei Klassen einteilen: In der ersten stehen solche, deren Affinität zum Sauerstoff größer ist als zum Stickstoff. Dazu gehören Mg, Ba, In, Tl, V^{IV}, Mo^{V}, Pb^{II},

Bi^{III}, U^{VI}, Fe^{III} und Co^{II}. Die zweite Gruppe mit Be, Cr^{III}, Fe^{II} und den Platinmetallen weist gegenüber Stickstoff und Sauerstoff die gleiche Assoziierungsneigung auf und Ag^{I}, Au^{I}, Cu^{II}, Hg^{II}, Co^{III} sowie Ni^{II} bilden als dritte Klasse fast ausschließlich Komplexe mit stickstoffhaltigen Liganden. Innerhalb dieser Gruppierungen können die verschiedenen Metalle noch weiter nach der Größe ihrer Komplexbildungstendenz geordnet werden (42). Betrachtet man nun die in den Tabellen I bis VIII festgehaltenen Kontrastierungsergebnisse, so fällt auf, daß die kontrasterhöhende Wirkung bei den für sauerstoffhaltige Liganden spezifischen Metallionen entsprechend der Zunahme der Komplexbildungstendenz ansteigt und daß umgekehrt jene Metalle, die fast ausschließlich Komplexe mit stickstoffhaltigen Molekülen bilden, wie z. B. Cu^{II} und Hg^{II}, den Kontrast der einzelnen Zellkomponenten fast nicht erhöhen (Abb. 17).

Die Neigung der in Abb. 17 aufgeführten Metallionen zur Bindung an Sauerstoff wird bereits durch die in wässerigen Lösungen gebildeten Ionenformen deutlich. Cäsium und Barium besitzen eine äußerst geringe Komplexbildungstendenz und liegen in H_2O wie Thallium über den gesamten pH-Bereich als monomere, kaum hydratisierte Ionen vor. Kobalt und Zinn bilden um pH=12-13 unter Anlagerung von Hydroxylionen Anionen der Form $[Co(OH)_4]^{2-}$ und $[SnO_2]^{2-}$ aus. Vom Blei sind in alkalischen Lösungen bereits dimere Kationen z. B. $[Pb(OH)_2Pb]^{2+}$ bekannt. Die Eisen III-, die Vanadyl- und die Uranylionen sind nur in sauren Lösungen beständig und fallen als hochpolymere Komplexe bereits bei pH=4-5 aus. Ihre Struktur im gelösten Zustand läßt sich als $[Fe(OH)_2Fe]^{2+}$, $[VO(OH)_2VO]^{2+}$ und $UO_2[(OH)_2UO_2]_n^{2+}$ beschreiben. In Lösungen von Uranylacetat liegt zudem noch das monomere Ion $[(CH_3COO)UO_2]^{+}$ vor. Es könnte nun der Einwand gemacht werden, daß die in Abb. 17 zu beobachtende Steigerung des Kontrastes weniger auf die Zunahme der Affinität der einzelnen Metallionen zu sauerstoffhaltigen, an das Präparat fixierten Liganden zurückzuführen, als vielmehr Ausdruck ihres unterschiedlichen Polymerisationsgrades ist. Dem stehen jedoch die Ergebnis-

se der Kontrastierung mit Wolframat-, Phosphorwolframsäure- und Molybdationen entgegen. In ihren wässerigen Lösungen liegen hier das monomere WO_4^{2-}-Ion und die beiden Polyionen $[P(W_3O_{10})_4]^{3-}$ und $[Mo_7O_{24}]^{6-}$ vor. Der erzielbare Kontrast ist in allen drei Fällen praktisch gleich groß, obwohl das Phosphorwolframsäureion bei annähernd gleicher Ladung zwölf WO_4^{2-} enthält.

Zur Klärung der Frage, zu welcher Molekülklasse die strukturgebundenen, sauerstoffhaltigen Liganden gehören, sind die Ergebnisse der einzelnen Blockierungsreaktionen von besonderer Bedeutung. Sie besagen, daß weder Hydroxyl- noch Carbonylgruppen für die Kontrastausbildung benötigt werden. Auf der anderen Seite entwickeln nach Veresterung der Säuregruppen und der Kontrastierung in methanolischer Lösung die nukleinsäurehaltigen Zellorganellen mit ihrem hohen Gehalt an stickstoffhaltigen Heterozyklen noch denselben Kontrast wie in den Kontrollschnitten und die Protonisierung mit H_2SO_4 führt bei Kontrastierung im organischen Lösungsmittel zu einer Kontrastminderung an Kernchromatin, Nukleolus, Ribosomen und Mitochondrien. Diese, den Ausführungen über die besondere Affinität der kontrastierenden Metallionen zu Sauerstoff anscheinend völlig widersprechenden Tatsachen lassen sich vielleicht in folgender Weise erklären:

Die Basen der Nukleinsäuren enthalten seitenständige Aminogruppen, deren Verhalten während der Fixierung unsicher ist. Nach Bahr (7) sollen sie durch OsO_4 nicht angegriffen werden, doch lassen die neuen Untersuchungen von Hake (45) eine Desaminierung möglich und eine Reaktion mit Glutaraldehyd wahrscheinlich erscheinen. Mit ihrer Beteiligung bei der Kontrastierung ist also kaum zu rechnen. Guanin, Cytosin, Thymin und Uracil enthalten seitenständig am Ringsystem Sauerstoffatome, die wie der tertiäre Stickstoff der Ringe bei der Ausbildung von Wasserstoffbindungen als Elektronendonatoren fungieren können. In organischen Lösungsmitteln mit geringer Wasserstoffionenkonzentra-

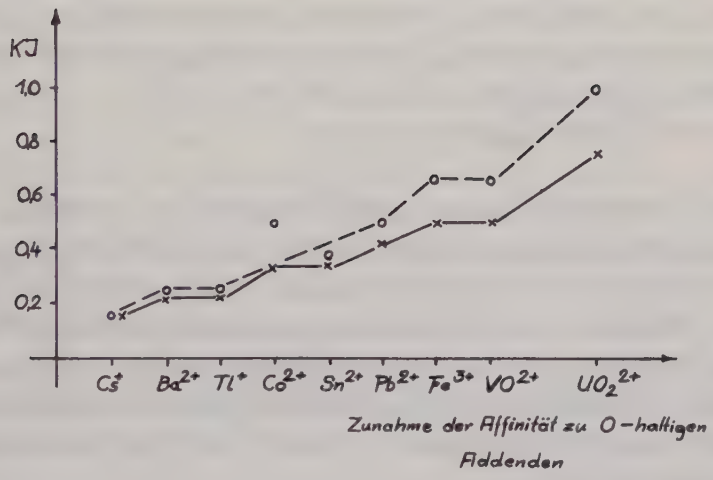


Abb. 17. Abhängigkeit des Kontrastverhältnisses (KJ) des Kernchromatins von der Komplexbildungstendenz und der Affinität zu sauerstoffhaltigen Addenden bei der Kontrastierung mit verschiedenen Metallionen im Bereich von pH=1 bis pH=7.

o nach Glutaraldehydfixierung

× nach OsO_4-Fixierung

tion stellen beide Elektronendonatoren für die Assoziation von Metallkationen dar, während diese Eigenschaft in wässerigen Salzlösungen mit einem pH-Wert zwischen O und 4 und nach der Behandlung mit konzentrierter H_2SO_4 durch die Protonisierung, d. h. die Anlagerung von H^+, zum größten Teil unterdrückt wird. Bei der Kontrastierung mit wässerigen Lösungen überwiegt deshalb die Bindung an die Sauerstoffsäuren, während im organischen Lösungsmittel die Metallionen im Sinne der Innerkomplexbildung gebunden werden.

Das Charakteristikum eines jeden aus Metallion und organischen Liganden gebildeten Komplexes ist seine Bildungs- oder Stabilitätskonstante K. Die Größe von K wird einerseits von den Eigenschaften des koordinierten Metallions - seiner Komplexbildungstendenz und seiner Spezifität - und andererseits von den Eigenschaften der Liganden, d. h. der Art ihrer koordinationsfähigen Gruppen, ihres sterischen Baues und endlich vom pH-Wert der Lösung bestimmt. K wird durch das Massenwirkungsgesetz definiert:

$$M + L \rightleftharpoons ML$$

$$\frac{[ML]}{[M]\,[L]} = K \qquad (I)$$

wobei $[ML]$ die Konzentration des im Gleichgewicht vorliegenden Komplexes, $[M]$ die der freien Metallionen und $[L]$ die der unbesetzen Liganden ist.

Bei der Kontrastierung ultrahistologischer Schnitte gibt der Kontrast des elektronenoptischen Bildes den Bruchteil der in der betrachteten biologischen Struktur vorliegenden Liganden an, die mit Metallionen besetzt sind (9). Er läßt sich deshalb proportional dem Verhältnis

$$\frac{[ML]}{[L] + [ML]} = \ominus \qquad (II)$$

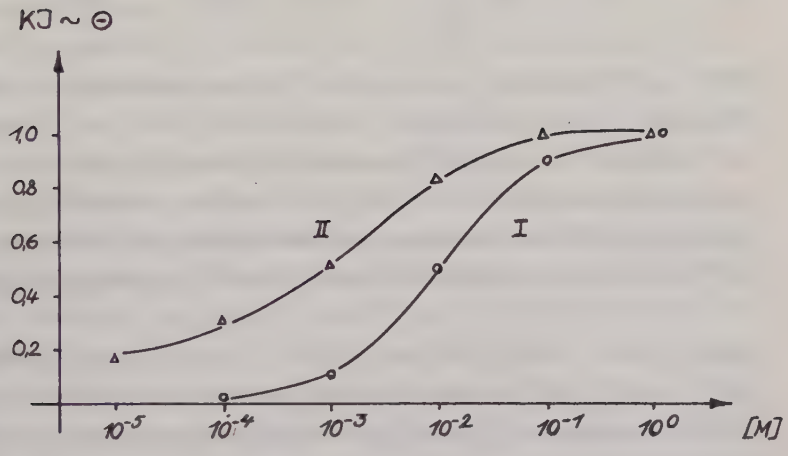


Abb. 18. Theoretische (I) und experimentell (II) gefundene Abhängigkeit des Kontrastverhältnisses (KJ~⊖) von der Konzentration der Metallionen.

I) mit K = 10

II) vergleiche Abb. 1

setzen und in Abhängigkeit von Gleichung (I) ergibt sich

$$\frac{\ominus}{1 - \ominus} = K[M] \qquad \text{(III)}$$

Trägt man $\ominus$ gegen die Konzentration $[M]$ auf, so erhält man für verschiedene K eine Kurvenschar, deren Einzelglieder parallel zueinander entlang der M-Achse verschoben sind. (Abb. 18). Ihre Form entspricht genau der in Abb. 1 dargestellten Funktion, welche die Abhängigkeit des ausgebildeten Kontrastes von der Konzentration der zum "Färben" verwendeten Uranylacetat- und der Kobaltchloridlösung beschreibt.

Liegen in einer Lösung neben den Metallionen zwei verschiedene Liganden (L_1 und L_2) vor, so stellt sich entsprechend dem Verhältnis ihrer Stabilitätskonstanten (K_1 und K_2) ein Gleichgewicht zwischen den unterschiedlichen Komplexen ein:

$$\frac{[ML_1][L_2]}{[ML_2][L_1]} = \frac{K_1}{K_2} \qquad \text{(IV)}$$

Bei den üblichen Kontrastierungsverfahren ist stets ein Überschuß an Metallionen in den Salzlösungen vorhanden, so daß alle möglichen Komplexe vollständig ausgebildet werden und die Unterschiede in ihren Bildungskonstanten im elektronenmikroskopischen Bild nicht deutlich hervortreten. Eine erste Differenzierung der am ultrahistologischen Präparat fixierten Komplexe nach der Größe ihrer Stabilitätskonstanten ist jedoch theoretisch bereits durch Wässern der "gefärbten" Schnitte möglich. Sobald die vollbesetzten Liganden der Ultrastrukturen in ein Volumen H_2O eingebracht werden, zerfallen sie solange in unbesetzte Liganden und freie Metallionen, bis sich das von den Stabilitätskonstanten beschriebene Gleichgewicht des Massenwirkungsgesetzes (I) eingestellt hat. Komplexe mit kleinem K zerfallen stärker als solche mit großem. Werden

von den leicht dissoziierenden Komplexen mehr Metallionen in die Lösung abgegeben als im Gleichgewicht der schwerer dissoziierbaren vorliegen können, so assoziieren sie sich an deren noch freie Liganden. Das Ergebnis dieser Gleichgewichtsreaktionen ist die fast völlige Dekontrastierung der leicht zerfallenden und die selektive Kontraststeigerung der ultrastrukturell gebundenen Liganden mit hohen Stabilitätskonstanten.

Versuche in dieser Richtung zeigten nur Kontraständerungen, die nicht in den Signifikanzbereich des in dieser Arbeit verwendeten Auswertverfahrens fielen. Sie sprechen dafür, daß die Stabilitätskonstanten aller gebildeten Komplexe groß sind. Unter Zuhilfenahme des Massenwirkungsgesetzes läßt sich ihre ungefähre Größe jedoch in folgender Weise bestimmen:

Die Ultradünnschnitte kommen nach der Kontrastierung in die Lösung eines Komplexbildners, der mit dem kontrastierenden Metallion einen Komplex bekannter Stabilität zu bilden vermag. Ist seine Bildungskonstante höher als die der Ultrastruktur-Metallkomplexe, so wird er von ihnen so viele Metallionen abziehen, daß es zu einer erkennbaren Dekontrastierung kommt. Es ließ sich damit zeigen, daß die von Fe III und Co II in wässerigen Lösungen am Ultradünnschnitt gebildeten Komplexe eine Stabilitätskonstante um 9 besitzen. Im Gegensatz zu diesen Metallionen wiesen die verschiedenen Zellkomponenten nach der Kontrastierung mit Bleihydroxyd und Uranylacetat eine unterschiedliche Stabilitätskonstante auf. In beiden Fällen ist die Bindung der Metalle an das Kernchromatin labiler als an die übrigen Strukturen des Gewebes (Vergleiche Tabelle XVI und XVII).

Wie aus Gleichung IV hervorgeht, ist die Höhe des Kontrastes der Ultrastrukturen bei der Dekontrastierung mit einem gelösten Komplexbildner (L_2) nicht nur von dessen Bildungskonstanten sondern auch von seiner Konzentration abhängig. Die Beziehung zwischen Kontrast ($\sim [ML_1]$),

den beiden Stabilitätskonstanten (K_1 und K_2) und der Konzentration des gelösten Liganden läßt sich ableiten.

Es sei die Gesamtkonzentration der am Ultradünnschnitt vorhandenen Liganden $[\mathcal{L}_1]$. Nach der Behandlung mit einer Salzlösung hoher Konzentration sind sie alle mit Metallionen besetzt. Unter der Annahme, daß das Verhältnis der Liganden zu den gebundenen Ionen 1 sei, läßt sich schreiben

$$[\mathcal{L}_1] = [\mathcal{M}] \qquad \text{(V)}$$

In der wässerigen Lösung zerfallen die nach der Kontrastierung vorhandenen Komplexe $[\mathcal{ML}_1]$ entsprechend zu

$$\frac{[ML_1]}{[M]\,[L_1]} = K_1 \qquad \text{(VI)}$$

mit $[ML_1]$ = noch vollständige Komplexe, $\sim$ dem Kontrast
$[M]$ = Konzentration der freien Metallionen
$[L_1]$ = unbesetzte Liganden der Ultrastrukturen

Andererseits bilden die frei werdenden Metallionen mit den gelösten Liganden $\mathcal{L}_2$ nach (I) neue lösliche Komplexe:

$$\frac{[ML_2]}{[M]\,[L_2]} = K_2 \qquad \text{(VII)}$$

mit $[ML_2]$ = Konzentration des ausgebildeten, gelösten Komplexes,
$[L_2]$ = Konzentration der unbesetzten gelösten Liganden

Zwischen den einzelnen Konzentrationen bestehen weiter die Beziehungen:

$$[\mathcal{L}_1] = [ML_1] + [L_1] \quad \text{(VIII)}$$

$$[\mathcal{L}_2] = [ML_2] + [L_2] \quad \text{(IX)}$$

und

$$[\mathcal{M}] = [ML_1] + [ML_2] + [M] \quad \text{(X)}$$

Zur weiteren Vereinfachung für die Durchrechnung wird gesetzt:

$[\mathcal{L}_2] = 10^x$ (Vereinfachung wegen der späteren Übertragung in das halblogarithmische Koordinatensystem!)

$[ML_1] = y$

$[\mathcal{L}_1] = [\mathcal{ML}_1] = a$

$[ML_2] = z$

damit ergibt sich:

(VI) $$\frac{y}{(a-y-z)\quad(a-y)} = K_1$$

(VII) $$\frac{z}{(a-y-z)\quad(10^x-z)} = K_2$$

VI : VII $$\frac{K_1}{K_2} = \frac{y}{(a-y)} \cdot \frac{(10^x - z)}{z}$$

mit $$z = a-y - \frac{y}{(a-y)\ K_1}$$

$$\frac{10^x}{\frac{(a-y)^2}{y} - \frac{1}{K_1}} - \frac{y}{(a-y)} = \frac{K_1}{K_2}$$

$$10^x = \left(\frac{K_1}{K_2} + \frac{y}{(a-y)}\right)\left(\frac{(a-y)^2}{y} - \frac{1}{K_1}\right)$$

$$x = \log\left(\frac{K_1}{K_2} + \frac{y}{a-y}\right) + \log\left(\frac{(a-y)^2}{y} - \frac{1}{K_1}\right) \qquad \text{(XI)}$$

Die Abhängigkeit $y = f(x)$ wurde an der Umkehrfunktion $x = f^{-1}(y)$ untersucht, da die Auflösung nach x leichter zu bewerkstelligen war. Das Kurvenbild der Umkehrfunktion stellt die Spiegelung der Funktion an der Winkelhalbierenden des ersten und dritten Quadranten dar. Für $y = f(x)$ ergibt sich das Bild der Abb. 19. Diese Funktion entspricht in allen Eigenschaften der experimentell bei der Dekontrastierung uranylacetat-"gefärbter" Dünnschnitte mit Äthylendiamintetraessigsäure bestimmten (Abb. 13).

Durch den Vergleich der theoretischen und der experimentellen Ergebnisse lassen sich deshalb folgende Aussagen machen:

$x = f^{-1}(y)$ kann geschrieben werden als

$$[\mathcal{L}_2] = \log\left(\frac{K_1}{K_2} + \frac{[ML_1]}{[M\mathcal{L}_1] - [ML_1]}\right) + \log\left(\frac{([M\mathcal{L}_1] - [ML_1])^2}{[ML_1]} - \frac{1}{K_1}\right)$$

Die theoretische Funktion ist in der Form der Abb. 19 nur dann stets bestimmbar, wenn $[ML_1]$, d. h. der während der Dekontrastierung beobachtbare Kontrast, bei jeder Konzentration des gelösten Liganden $\mathcal{L}_2$ kleiner als $[M\mathcal{L}_1]$, also dem vor dem Einbringen der Schnitte in die Lösung vorhandenen Kontrast ist. Dies ist stets der Fall, da der Komplex $M\mathcal{L}_1$ bereits im reinen Lösungsmittel nach Gleichung (VI) zerfällt. Die experimentell erhaltene Funktion strebt für $\mathcal{L}_2 \longrightarrow 0$ einem durch diese

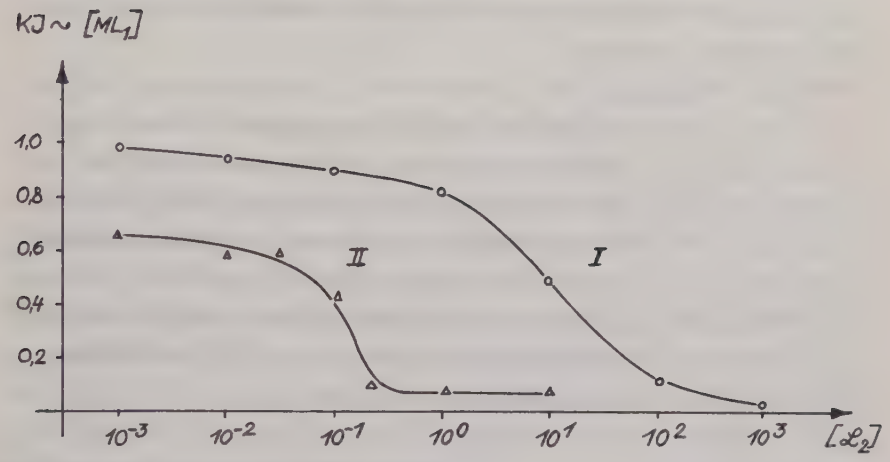


Abb. 19. Theoretische (I) und experimentell (II) gefundene Abhängigkeit des Kontrastverhältnisses ($KJ \sim [ML_1]$) von der Konzentration der gelösten Liganden $\mathcal{L}_2$ bei der Dekontrastierung.

I) berechnet für $K_1 = K_2$ 10

II) vergleiche Abb. 13

Gleichung festgelegten Kontrastgrenzwert zu und erreicht den Ausgangskontrast nicht mehr.

Die Abhängigkeit des beobachtbaren Kontrastes vom Verhältnis der beiden Stabilitätskonstanten und der Konzentration von $\mathcal{L}_2$ läßt sich an drei Sonderfällen beschreiben:

$K_1 = K_2$: Er wird nur vom Konzentrationsverhältnis der gebundenen und der gelösten Liganden beeinflußt.

$K_1 \ll K_2$: Die Funktion $y = f(x)$ verläuft sehr steil und strebt bereits bei einer den gebundenen Liganden entsprechenden Konzentration von $\mathcal{L}_2$ gegen O.

$K_1 \gg K_2$: Es sind sehr hohe Konzentrationen von $\mathcal{L}_2$ nötig, um eine Kontrastabnahme an den Ultrastrukturen zu erzeugen.

Unter diesen Gesichtspunkten wird deutlich, daß die Tabellen XIV bis XVII tatsächlich nur die Größenordnung der Stabilitätskonstanten der Ultrastruktur-Metallkomplexe angeben können. Erst bei genauer Kenntnis der Stabilitätskonstanten läßt sich dieses Verfahren in Form einer komplexometrischen Titration zur Bestimmung von Anzahl und Art der im Präparat vorhandenen Liganden verwenden.

Zobel und Beer (120) fanden für den aus Uranylionen und gereinigter DNS bestehenden Komplex in wässeriger Lösung eine Bildungskonstante von log K = 6,9. Um pH=3,5 soll dabei ein UO_2^{2+} pro zwei Phosphatgruppen gebunden werden. Dieses 1:2 Verhältnis kann sich mit steigendem pH-Wert in ein UO_2^{2+}/Phosphatverhältnis von 1:1 umwandeln. Wenn für die Bindung von UO_2^{2+} an das DNS-Molekül lediglich die Phosphatgruppen verantwortlich sind, so müßte die Stabilitätskonstante des RNS - UO_2 - Komplexes ebenfalls in etwa um 7 liegen. Die Versuche zur Bestimmung dieser Konstanten an den Nukleinsäuremolekülen im ultrahistologischen

Schnitt führen jedoch erstens zu wesentlich höheren Werten ($\log K_{DNS-UO_2} > 9$) und zeigen zweitens, daß außer Phosphatgruppen noch andere Faktoren für ihre Größe verantwortlich sind, da $\log K_{RNS-UO_2} \gg \log K_{DNS-UO_2}$ ist. Möglicherweise werden diese Unterschiede durch die abweichenden makromolekularen Strukturen der fixierten RNS und DNS bedingt.

Bei der Kontrastierung mit Bleihydroxyd schlägt Reynolds (91) eine Lösung aus annähernd äquimolaren Anteilen $Pb(OH)_2$ und Zitronensäure vor. Die Stabilitätskonstante des Bleizitratkomplexes bei pH=12 ($\log K = 5,8$) ist niedriger als jene der Bleiultrastrukturkomplexe, so daß die Bleiionen im Sinne der obigen Aussagen an sie abgegeben werden. Wie wenig die Konstanten bei der Färbung glutaraldehydfixierter Schnitte mit $Pb(OH)_2$ jedoch verschieden sind, zeigt bereits das normale elektronenmikroskopische Bild, auf welchem das Kernchromatin häufig nur schwach kontrastiert ist. Durch eine Erhöhung des Zitronensäureanteils lassen sich das DNS-Chromatin und auch die übrigen Zellstrukturen vollständig dekontrastieren, lediglich die Zellwand behält die an sie gebundenen Bleiionen. Wie die "Entfärbung" des DNS-Uranylkomplexes mit Äthylendiamintetraessigsäure kann die Behandlung der Ultradünnschnitte mit einer $Pb(OH)_2$/Zitronensäurelösung im Verhältnis 1:10 deshalb als selektives Kontrastierungsverfahren verwendet werden.

Zum spezifischen Nachweis einzelner chemischer Zellkomponenten lassen sich auch die zur Klärung der Bindungsstellen der Metallionen angewendeten Blockierungsreaktionen benützen. Der Kontrast von Ultrastrukturen, die K hlenhydrate als Bausteine enthalten, kann durch Phosphorylierung derselben nach Glutaraldehydfixierung signifikant gesteigert werden. Mögliche Nebenreaktionen des Phosphoroxytrichlorids mit Sulfhydryl- und Aminogruppen können vernachlässigt werden, da weder nach Behandlung der Gewebeblöcke mit $NaNO_2$ noch mit Dinitrofluorobenzol eine Kontrastabnahme festzustellen war und diese Seitengruppen durch die Fixierung mit großer Wahrscheinlichkeit eliminiert werden.

Die Veresterung der Carboxyl-, Phosphat- und Schwefelsäuregruppen mit Methylalkohol bietet die Möglichkeit, ihre Beteiligung am Aufbau von Zellkomponenten sichtbar zu machen und ihr Vorkommen mit dem Elektronenmikroskop um ein Vielfaches genauer in den Zellorganellen zu lokalisieren als mit der lichtmikroskopischen Histologie. Die Differenzierung in Carboxylrest, Phosphatrest und Schwefelsäurerest läßt sich durch vorsichtige Hydrolyse der gebildeten Ester mit verdünnter NaOH direkt am ultrahistologischen Schnitt durchführen (Vergl. Abb. 6).

Wie experimentell festgestellt wurde, kann bei der Methylierung ultrahistologischer Schnitte gleichzeitig eine Differenzierung von DNS und RNS vorgenommen werden. In wässerigen Salzlösungen lagern sich die Metallionen bei der Kontrastierung fast ausschließlich an Säuregruppen an. Von diesen lassen sich die Carboxyl-Methylester bereits während 12 Stunden bei 37° C bilden. Gleichzeitig mit der Veresterung der Carboxylgruppen wird durch die in der Lösung vorhandene Salzsäure die RNS extrahiert. Kontrastiert man die Schnitte nun nicht mit Uranylacetat sondern mit Bleihydroxyd, so werden die in den Mitochondrien vorhandenen Phosphatgruppen kaum "angefärbt" und auf dem elektronenmikroskopischen Bild sind nur noch die DNS-Strukturen des Kernchromatins zu sehen. Die Extraktion von RNS aus Ultradünnschnitten aldehydfixierten Gewebes mit Salzsäure beschrieben bereits Leduc und Bernhard (60). Der Vorteil des hier beschriebenen Verfahrens liegt jedoch in der durch die gleichzeitige Methylierung möglich gewordene selektive Darstellbarkeit der DNS, deren Proteinkomplex nach der vierstündigen Glutaraldehydfixierung (Leduc und Bernhard fixierten mit Formalin nur 15-50 Minuten) der Säurehydrolyse anscheinend widersteht.

E) ZUSAMMENFASSUNG

Zur Untersuchung einer selektiven Kontrastierbarkeit von Bestandteilen pflanzlicher Zellen wurden Ultradünnschnitte des Meristemgewebes von Allium cepa Wurzelspitzen nach Osmiumtetroxyd- und nach Glutaraldehydfixierung mit 24 Metallverbindungen unter verschiedenen pH-Verhältnissen behandelt. Eine ausgesprochene Spezifität eines Elementes für bestimmte Strukturmoleküle konnte dabei nicht festgestellt werden.

Durch selektive Blockierungsreaktionen an den wichtigsten Gruppen der Zellbestandteile ließen sich für die Kontrastierung glutaraldehydfixierter Präparate drei Reaktionstypen nachweisen:

1.) Bei der Kontrastierung mit wässerigen Salzlösungen wird der größte Teil des Kontrastes durch die Elektroadsorption der Metallionen hervorgerufen. Die Kationen werden dabei von pH=1 bis pH=13 ausschließlich an Carboxyl- und Phosphatgruppen gebunden während für die Anheftung der Anionen in gut fixiertem Gewebe im allgemeinen nur die im sauren pH-Bereich protonisierbaren Stickstoffatome der Heterozyklen zur Verfügung stehen.

2.) Durch Einlagerung von Phosphorwolframsäure in die poröse, inhomogene Struktur der Zellorganellen können diese in der Art des "negative staining" kontrastiert werden.

3.) In wässerigen, besonders aber in alkoholischen Salzlösungen entstehen aus den Strukturmolekülen der Zellkomponenten und den Metallionen Komplexverbindungen in Form der Innerkomplexsalze. Die Ausbildung der nebenvalenten Bindungen ist in wässerigen Lösungen unter pH=7 durch die Protonisierung der potentiellen Elektronendonatoren erschwert.

Durch Vergleich der Stabilität der am Ultradünnschnitt ausgebildeten Metallkomplexe mit jener bekannter Komplexverbindungen konnte die Größenordnung einiger Bildungskonstanten (log k) bestimmt werden: Sie liegen für die Anlagerung von FeIII- und Co II-Ionen an die Ultrastrukturen um 9 und für Pb II-Ionen um 6.

Für den Uranylion-DNS-Komplex ist log k $>$ 9 und wesentlich kleiner als die Stabilitätskonstanten der Uranylkomplexe der übrigen Zellbestandteile. Diese unterschiedlichen Stabilitätskonstanten ließen sich in Form einer komplexometrischen Titration zum selektiven Nachweis von DNS in Ultradünnschnitten verwenden. Die Abhängigkeit der Differenzierungsmethode von den Konstanten der Komplexe sowie von den Konzentrationen des Metallions und der einzelnen Liganden wurde theoretisch abgeleitet und durch den Versuch bestätigt.

Aus den experimentellen Ergebnissen der Blockierungsreaktionen am fixierten, uneingebetteten Gewebe und an ultrahistologischen Schnitten ergaben sich weitere selektive Kontrastierungsverfahren für Nukleinsäuren im allgemeinen, DNS und RNS im besonderen, sowie für Säuregruppen und Kohlenhydrate. Ihre Signifikanz wurde diskutiert.

F) LITERATURVERZEICHNIS

1. ADAMS, C. W. M. :
Osmium tetroxide and the Marchi method: Reactions with polar and non-polar lipids, protein and polysaccharide.
J. Histochem. Cytochem. 8, 262 (1960)

2. AFZELIUS, B. A. :
Chemical fixatives for electron microscopy.
In: "The interpretation of ultrastructure"
ed. by Harris, R. J. C., Vol. 1. New York: Acad. Pr. 1962

3. AFZELIUS, B. A. :
Electron microscopy of the sperm tail; results obtained with a new fixative.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 5, 269 (1959)

4. AVERS, C. J., and KING, E. E. :
Histochemical evidence of intracellular enzymatic heterogeneity of plant mitochondria.
Am. J. Botany 47, 220 (1960)

5. BAHR, G. F. :
Gallozyanin-indiumalum; Electron stains I.
Exptl. Cell Res. 5, 551 (1953)

6. BAHR, G. F., and MOBERGER, G. :
Methyl-mercury chloride as a specific reagent for proteinbound sulfhydryl groups.
Exptl. Cell Res. 6, 506 (1954)

7. BAHR, G. F. :
Osmium tetroxide and ruthenium tetroxide and their reactions with biologically important substances.
Exptl. Cell. Res. 7, 475 (1954)

8. BAHR, G. F., BLOOM, G., and FRIBERG, U.:
Volume changes of tissues in physiological fluids during fixation in osmium tetroxide or formaldehyde and during subsequent treatment.
Exptl. Cell Res. 12, 342 (1957)

9. BEER, M.:
Selective staining for electron microscopy.
Laborat. Investig. 14, 1020 (1965)

10. BJERRUM, J., SCHWARZENBACH, G., and SILLÉN, L. G.:
Stability constants of metal-ion complexes with solubility products of inorganic substances.
London: The Chemical Society 1958.

11. BENEDETTI, E. L., and BERTOLINI, B.:
The use of phosphotungstic acid (PTA) as a stain for the plasma membrane.
J. Roy. Microscop. Soc. 81, 219 (1963)

12. BENNETT, H. S., and LUFT, J. H.:
s-Collidine as a basis for buffering fixatives.
J. Biophys. Biochem. Cyt. 6, 113 (1959)

13. Biochemisches Taschenbuch II. Hrsg. v. H. M. Rauen.
Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York: Springer-Verl. 1964

14. BLOUGH, H. A.:
Selective inactivation of biological activity of Myxoviruses by glutaraldehyde.
J. Bact. 92, 266 (1966)

15. BRADBURY, S., and MEEK, G. A.:
A study of potassium permanganate "fixation" for electron microscopy.
Quart. J. Microscop. Sci. 101, 241 (1960)

16. CALLAHAN, W. P., and HORNER, J. A.:
The use of vanadium as a stain for electron microscopy.
J. Cell Biol. 20, 350 (1964)

17. CALVET, F. B., SIEGEL, M., and STERN, K. G.:
Electron optical observations of chromosome structure in resting cells.
Nature 162, 305 (1948)

18. CANTAROW, A., and SCHEPARTZ, B.:
Biochemistry. 3rd ed.
Philadelphia-London: W. B. Saunders Company 1962

19. CARO, L. G., van TUBERGEN, R. P., and PORRO, F.:
The localisation of deoxyribonucleic acid in E. coli.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 491 (1958)

20. CASSELMAN, W. G. B.:
Cytological fixation by chromic acid and dichromates.
Quart. J. Microscop. Sci. 96, 203 (1955)

21. CAULFIELD, J. B.:
Effects of varying the vehicle for OsO_4 in tissue fixation.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 3, 827 (1957)

22. CRAWFORD, G. N. C., and BARER, R.:
The action of formaldehyde on living cells as studied by phase-contrast microscopy.
Quart. J. Microscop. Sci. 92, 403 (1951).

23. CLAUDE, A.:
Fixation of nuclear structure by unbuffered solutions of osmium tetroxide in slightly acid distilled water. Proc. 5th. intern. Congr. Electron Microscopy, Vol. 2. New York: Acad. Pr. 1962

24. CRIEGEE, R.:
Osmic acid esters as intermediate products in oxidation.
Justus Liebigs Ann. Chem. 522, 75 (1936)

25. DALLAM, R. D. :
Determination of protein and lipid lost during osmic acid fixation of tissues and cellular particulates.
J. Histochem. Cytochem. 5, 178 (1957)

26. DALTON, A. J. :
A chrome-osmium fixative for electron microscopy.
Anat. Rec. 121, 281 (1955)

27. DALTON, A. J. , and ZEIGEL, R. F. :
A simplified method of staining thin sections of biological material with lead hydroxide for electron microscopy.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 409 (1960).

28. EPSTEIN, M. A. , and HOLT, S. J. :
Site and nature of Adenovirus nucleic acid.
Nature 187, 1050 (1960)

29. FALK, H. :
Zum Nukleolus-Feinbau bei Allium cepa.
Protoplasma 54, 432 (1962)

30. FERNANDEZ-MORAN, H. , and SCHRAMM, G. :
The structure of TMV as revealed in ultrathin section by electron microscopy.
Z. Naturforschung 13b, 68 (1958)

31. FINCK, H. :
Epoxy resins in electron microscopy.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 27 (1960)

32. FINEAN, J. B. :
Electron microscope and X-ray diffraction studies of a saturated synthetic phospholipide.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 6, 123 (1959)

33. FRAENKEL-CONRAT, H., and MECHAM, D. K.:
The reaction of formaldehyde with proteins. VII
Demonstration of intermolecular crosslinking by means of osmotic pressure measurements.
J Biol. Chem. 177, 477 (1949)

34. FRENCH, D., and EDSALL, J. T.:
Reaktionen von Formaldehyd mit Aminosäuren und Proteinen.
Adv. Prot. Chem. 2, 277 (1945)

35. FRENSTER, J. H., ALLFREY, V. G., and MIRSKY, A. E.:
In vitro incorporation of amino acids into the proteins of isolated nuclear ribosomes
Biochim. Biophys. Acta 47, 130 (1961)

36. FREY-WYSSLING, A., and MÜHLETHALER, K.:
Ultrastructural Plant Cytology.
Amsterdam-London-New York: Elsevier Publ. Compl. 1965

37. GALL, J. G.:
The nuclear envelope after $KMnO_4$ fixation.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 6, 115 (1959)

38. GERSH, I., ISENBERG, I., STEPHENSON, J. L., and BONDAREFF, W.
Submicroscopic structure of frozen dried liver, specifically stained for electron microscopy.
Anat. Rec. 128, 91 (1957)

39. GLAUERT, A. M:
A survey of embedding media for electron microscopy.
J. Roy. Microscop. Soc. 80, 269 (1962)

40. GOLDIN, M. J.:
Investigation of TMV in ultrathin sections.
Virology 10, 538 (1960)

41. GREEN, D. E., and FLEISCHER, S.:
The role of lipids in mitochondrial electron transfer and oxydative phosphorylation.
Biochim. Biophys. Acta 70, 554 (1963)

42. GRINBERG, A. A.:
Einführung in die Chemie der Komplexverbindungen.
Berlin: VEB Verlag Technik 1955

43. HALL, C. E., JAKUS, M. A., and SCHMITT, F. O.:
The structure of certain muscle fibrils as revealed by the use of electron stains.
J. Appl. Physics 16, 459 (1945)

44. HALL, C. E.:
Electron densitometry of stained virus particles.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 1 (1955)

45. HAKE, T.:
Studies on the reactions of OsO_4 and $KMnO_4$ with amino acids, peptides, and proteins.
Laborat. Investig. 14, 1208 (1965)

46. HARBERS, E.:
Die Nukleinsäuren.
Stuttgart: Georg Thieme Verlag 1964

47. HARMS, H.:
Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie.
Kamp-Lintfort: Staufen Verlag Paul Bercker 1965

48. HAYES, T. L., LINDGREN, F. T., and GOFMAN, J. W.:
A quantitative determination of the osmium tetroxide - lipoprotein interaction.
J. Cell Biol. 19, 251 (1963)

49. HUXLEY, H. E., and ZUBAY, G.:
Electron microscope observations on the structure of microsomal particles from E. coli.
J. Mol. Biol. 2, 10 (1960)

50. HUXLEY, H. E., and ZUBAY, G.:
Preferential staining of nucleic acid-containing structures for electron microscopy.
J Biophys. Biochem. Cytol. 11, 273 (1961)

51. JURAND, A.:
Activity of nucleases on Paramecium cells fixed with osmium tetroxide. Exptl. Cell Res. 25, 80 (1961)

52. KAHN, A. A., RIEMERSMA, J. C., and BOOIJ, H. L.:
The reactions of osmium tetroxide with lipids and other compounds.
J. Histochem. Cytochem. 9, 560 (1961)

53. KARNOVSKY, M. J:
Simple methods for "staining with lead" at high pH in electron microscopy.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 11, 729 (1961)

54. KAYE, G., and MOSES, M. J.:
Combinations of formaldehyde and permanganate as fixatives for light and electron microscopy.
Anat. Rec. 136, 222 (1960)

55. KENDALL, P. A., and BARNARD, E. A.:
An electron stain for protein.
J. Roy. Microscop. Soc. 81, 203 (1963)

56. KRAUSE, W., und DEUTSCH, K.:
Eine quantitative Bestimmung des Osmiumgehaltes von Rinderserumalbumin nach Fixierung mit Osmiumtetroxyd.
Z. Naturforschung 19b, 656 (1964)

57. LAMB, W. G. P, STUART-WEBB, J., BELL, L. G., BOVEY, R., and DANIELLI, J. F.:
Specific stains for electron microscopy.
Exptl. Cell Res. 4, 159 (1953)

58. LATTA, H.:
The plasma membrane of glomerular epithelium.
J. Ultrastr. Res. 6, 407 (1962)

59. LAWN, A. M.:
The use of potassium permanganate as an electron-dense stain for sections of tissue embedded in epoxy-resin.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 197 (1960)

60. LEDUC, E. H., and BERNHARD, W.:
Ultrastructural cytochemistry enzyme and acid hydrolysis of nucleic acids and protein.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 10, 437 (1961)

61. LEDUC, E., MARINOZZI, V., and BERNHARD, W.:
The use of water-soluble glycomethacrylate in ultrastructural cytochemistry.
J. Roy. Microscop. Soc. 81, 119 (1963)

62. McLEAN, J. D., and SINGER, S. J.:
Cross-linked polyampholytes. New water-soluble embedding media for electron microscopy.
J. Cell. Biol. 20, 518 (1964)

63. LIPPERT, W.:
Bemerkungen zu Veränderungen bei elektronenmikroskopischen Schnitten durch den abbildenden Elektronenstrahl und zur Struktur der eingebetteten Gewebe.
Z. Naturforschung 20b, 775 (1965)

64. LOW, F. N. :
The electronmicroscopy of sectioned lung tissue after varied duration of fixation in buffered OsO_4.
Anat. Rec. 120, 827 (1954)

65. LOW, F. N., and FREEMAN, J. A. :
Some experiments with chromium compounds as fixers for electron microscopy.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 629 (1956)

66. LUFT, J. H. :
Permanganate - a new fixative for electron microscopy.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 799 (1956)

67. LUFT, J H. :
The use of acrolein as a fixative for light and electron microscopy.
Anat. Rec. 133, 305 (1959)

68. LUFT, J H. :
Improvements in epoxy resin embedding methods.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 409 (1961)

69. LUFT, J. H., and WOOD, R. L. :
The extraction of tissue protein during and after fixation with osmium tetroxide in various buffer systems.
J. Cell Biol. 19, 46A (1963)

70. MARINOZZI, V. et GAUTIER, A. :
Essais de cytochimie ultrastructurale. Du rôle de l'osmium réduit dans les "colorations" électroniques.
C. R. Acad. Sci., Paris, 253, 1180 (1961)

71. MARINOZZI, V. et GAUTIER, A. :
Fixations et Colorations. Etude des affinités des composants nucléoprotéiniques pour l'hydroxyde de plomb et l'acétate d'uranyle.
J. Ultrastr. Res. 7, 436 (1962)

72. MARTELL, A. E. und CALVIN, M. :
Die Chemie der Metallchelat-Verbindungen.
Weinheim/Bergstr. : Verlag Chemie 1958

73. MAYOR, H. D. , and JORDAN, L. E. :
Acrolein - a fine structure fixative for viral cytochemistry.
J. Cell Biol. 18, 207 (1963)

74. MENKE, W. :
Artefakte in elektronenmikroskopischen Präparaten.
II. Zur Fixierung von Chloroplasten mit Osmiumtetroxyd.
Z. Naturforschung 12b, 656 (1957)

75. MERCER, E. H. :
A scheme for section staining in electron microscopy.
J. Roy. Microscop. Soc. 81, 179 (1963)

76. METZNER, H. :
Cytochemische Untersuchungen über das Vorkommen von Nukleinsäuren in Chloroplasten.
Biol. Zbl. 71, 257 (1952)

77. MILAS, N. A. , TREPAGNIER, J. H. , NOLAN, J. T. , and ILIOPULOS, M. J. :
A study of the hydroxylation of olefins and the reaction of osmium tetroxide with 1, 2-glycols.
J Am. Chem. Soc. 81, 4730 (1959)

78. MILLONIG, G. :
A modified procedure for lead staining of thin sections.
J. Cell Biol. 11, 736 (1961)

79. MILLONIG, G. :
Further observations on a phosphate buffer for osmium solutions in fixation.
Proc. 5th. Intern. Congr. Electron Micr. Vol. 2
New York: Acad. Pr. 1962

80. MOLLENHAUER, H. H. :
Permanganate fixation of plant cells.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 6, 431 (1959)

81. MOOR, H. :
Die Gefrierfixation lebender Zellen und ihre Anwendung in der Elektronenmikroskopie.
Z. Zellforschung 62, 546 (1964)

82. MORGAN, C., MOORE, D. H., and ROSE, H. H. :
Some effects of the microtome knife and electron beam on methylcrylate-embedded thin sections.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 4 (1956)

83. MORITA, S., ITO, K., and TOMITA, A. :
Electron microscopy of salivary gland chromosomes fixed with butyric acid.
Idengaku Zasshi. 29, 68 (1954)

84. O'DONNELL, E. H. J. :
Deoxyribonucleic acid structures in the nucleolus.
Nature 191, 1325 (1961)

85. Organic sequestering agents.
New York: John Wiley & Sons, Inc. 1959

86. ORNSTEIN, L. :
"Osmiophilia", fact or fiction?
J. Biophys. Biochem. Cytol. 3, 809 (1957)

87. PALADE, G. E. :
A study of fixation for electron microscopy.
J. Exp. Med. 95, 285 (1952)

88. PALADE, G. E. :
The fixation of tissue for electron microscopy.
Proc. Intern. Conf. Electr. Micr.
London 1954

89. REBHUN, L.:
Application of freeze-substitution to electron microscope studies of invertebrate oocytes.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 785 (1961)

90. REIMER, L.:
Untersuchungen zum Massenverlust von Einbettungsmitteln (Methacrylat, Vestopal und Araldit) unter Elektronenbeschuß.
Z. Naturforschung 14b, 566 (1959)

91. REYNOLDS, E. S.:
The use of leadcitrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.
J. Cell Biol. 17, 208 (1963)

92. RHODIN, J.:
Correlation of ultrastructural organisation and function in normal and experimentally changed proximal concoluted tubule cells of the mouse kidney.
Stockholm: Aktiebolaget 1954

93. RICHARDS, A. G.:
An empirical survey of inorganic compounds useful as stains.
J. App. Phys. 23, 158 (1952)

94. RIEMERSMA, J. C., and BOOIJ, K. L.:
The reaction of osmium tetroxide with lecithin. Application of staining procedures.
J. Histochem. Cytochem. 10, 89 (1962)

95. ROBBINS, E.:
Some theoretical aspects of somium tetroxide fixation with special reference to the metaphase chromosomes of cell-cultures.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 11, 449 (1961)

96. ROTHSTEIN, A., and MEIER, R.:
The relationship of the cell surface to metabolism.
VI. The chemical nature of uranium-complexing groups of the cell surface.
J. Cell & Comp. Physiol. 38, 245 (1951)

97. SABATINI, D. D., BENSCH, K , and BARRNETT, R. J.:
Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation.
J. Cell Biol. 17, 19 (1963)

98. SEDAR, A. W.:
Electron microscopy of the oxyntic cell in the gastric glands of the bullfrog, Rana catesbiana.
III. Permanganate fixation of the endoplasmic reticulum.
J. Cell Biol. 14, 152 (1962)

99. SETTERFIELD, G., and BAYLEY, S. T.:
Structure and physiology of cell walls.
Ann. Rev. Plant. Physiol. 12, 35 (1961)

100. STAFFORD, H. A.:
Intracellular localization of enzymes in pea seedlings.
Physiol. Plantarum 4, 696 (1951)

101. STEMPAK, J. G., and WARD, R. T.:
An improved staining method for electron microscopy.
J. Cell Biol. 22, 697 (1964)

102. STOCKING, C. R., and GIFFORD, E. M., jr.:
Incorporation of thymidine into chloroplasts of Spirogyra.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1, 159 (1959)

103. STOECKENIUS, W.:
Osmium tetroxide fixation of lipids.
Proc. Europ. Reg. Conf. Electr. Micr., Delft 1960

104. STOECKENIUS, W.:
Electron microscopy of DNA molecules "stained" with heavy metal salts.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 11, 297 (1961)

105. STOECKENIUS, W., and MAHR, S. C.:
Studies on the reaction of osmium tetroxide with lipids and related compounds.
Laborat. Investig. 14, 1196 (1965)

106. STRANGEWAYS, T. S. P., and CANTI, R. G.:
The living cell in vitro as shown by dark-ground illumination and the changes induced in such cells by fixing reagents.
Quart. J. Microscop. Sci. 71, 1 (1927)

107. STRUGGER, S.:
Die Uranylkontrastierung für die elektronenmikroskopische Untersuchung der Pflanzenzellen.
Naturwissenschaften 43, 357 (1956)

108. VENABLE, J. H., and COGGESHALL, R.:
A simplified leadcitrate stain for use in electron microscopy.
J. Cell Biol. 25, 407 (1965)

109. WATSON, M. L.:
Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 727 (1958)

110. WATSON, M. L., and ALDRIDGE, W. G.:
Methods for the use of indium as an electron stain for nucleic acids.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 11, 257 (1961)

111. WEINSTEIN, R., ABBISS, T., and BULLIVANT, S.:
The use of double and triple uranyl salts as electron stains.
J. Cell Biol. 19, 74 A (1963)

112. WETZEL, B. K. :
Sodium permanganate fixation for electron microscopy.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 711 (1961)

113. WETZEL, M. G., WETZEL, B. K., and SPICER, S. S. :
Ultrastructural localization of acid mucosubstances in the mouse colon with iron-containing stains.
J. Cell Biol. 30, 299 (1966)

114. WHALEY, W. G., and MOLLENHAUER, H. H. :
The golgi-apparatus and cell plate formation - a postulate.
J. Cell Biol. 17, 216 (1963)

115. WIGGLESWORTH, V. B. :
The use of osmium in the fixation and staining of tissue.
Proc. Roy. Soc. London, Series B, 147, 185 (1957)

116. WIGGLESWORTH, V. B. :
The union of protein and nucleic acid in the liver cell and its demonstration by osmium staining.
Quart. J. Microscop. Sci. 105, 113 (1964)

117. WOLMAN, M. :
The reaction of osmium tetroxide with tissue components.
Exptl. Cell Res. 12, 231 (1957)

118. WOOD, R. L., and LUFT, J. H. :
The influence of the buffer system on fixation with osmium tetroxide.
J. Cell Biol. 19, 83 A (1963)

119. ZETTERQVIST, H. :
The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum.
Dept. Anat. Karolinska Inst. Stockholm

120. ZOBEL, C. R., and BEER, M. :
Electron stains I. Chemical studies on the interaction of DNA with uranyl salts.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 10, 335 (1961)

Auch an dieser Stelle möchte ich nicht versäumen, Herrn Prof. Dr. Leo Brauner für die freundliche Förderung meiner Arbeit zu danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Anton Mayr für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines ausgezeichneten Arbeitsplatzes im Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere. Ihm und Herrn Priv. Doz. Dr. Helmut Mahnel bin ich außerdem für wertvolle Anregungen zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 15. August 1940 wurde ich als Sohn des Forstwartes Josef Siegl und seiner Ehefrau Rosa, geb. Brandner, in Wickwitz/Sudetenland geboren. Zusammen mit meinen Eltern kam ich im Frühjahr 1946 nach Ebenhofen im Allgäu. Dort besuchte ich fünf Klassen der Volksschule und trat anschließend in die Oberrealschule Kaufbeuren ein. 1961 legte ich an ihr die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1961/62 immatrikulierte ich mich an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München für das Studium der Biologie.

Seit dem 1. August 1965 bin ich am Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Tierärztlichen Fakultät der Universität München angestellt.